

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Malte Wachsmuth
aus Stade

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 2001

**Fluoreszenzfluktuationsmikroskopie:
Entwicklung eines Prototyps,
Theorie und Messung der Beweglichkeit
von Biomolekülen im Zellkern**

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Langowski
Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer

Fluoreszenzfluktuationsmikroskopie: Entwicklung eines Prototyps, Theorie und Messung der Beweglichkeit von Biomolekülen im Zellkern

Zusammenfassung

Die Theorie der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) wird für Anwendungen in lebenden Zellen erweitert. Zellen enthalten statistisch organisierte Polymere, Membransysteme und geschlossene Kompartimente, die zu behinderter oder anomaler Diffusion führen. Es wird gezeigt, wie der Einfluss von Bindung an zelluläre Strukturen in FCS-Messungen berücksichtigt werden kann. Desweiteren wird ein Aufbau zur kombinierten FCS und konfokalen Laserscanningmikroskopie (CLSM) vorgestellt, das Fluoreszenzfluktuationsmikroskop (FFM). Es wird im Hinblick auf Auflösungsvermögen und Abbildungseigenschaften charakterisiert. Anschließende FCS-Messungen von EGFP und einer EGFP-Chimäre in Zellen zeigen behinderte Diffusion vor allem im Kern mit einer im Vergleich zu Wasser etwa 4fach höheren intrazellulären Viskosität. Aus weiteren Experimenten mit angefärbtem Chromatin und Testmolekülen verschiedener Größe folgt, dass der Einfluss des Chromatins auf die Diffusion von der Teilchengröße abhängt. Auch die Beweglichkeit funktioneller Proteine wird anhand des Transkriptionsterminationsfaktors TTF-I untersucht. Er ist im Nukleolus gebunden und im Rest des Kerns beweglich. Die Lebensdauer des gebundenen Zustands beträgt ca. 27 s.

Fluorescence fluctuation microscopy: Design of a prototype, theory and measurements of the mobility of biomolecules in the cell nucleus

Abstract

The theory of fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is expanded for the application in living cells. Cells contain statistically organized polymers, membranes, and closed compartments leading to obstructed or anomalous diffusion. The impact of binding to cellular structures on FCS is also considered. In addition, an experimental setup combining FCS and confocal laser scanning microscopy (CLSM) is presented, the fluorescence fluctuation microscope (FFM). Resolution and imaging properties are characterized. Subsequent FCS experiments of EGFP and an EGFP chimera in cells show obstructed diffusion mainly in the nucleus with an approximately 4fold larger intracellular viscosity compared to water. Further experiments with labeled chromatin and tracer molecules of various sizes reveal that the impact of chromatin on diffusion properties depends on the size of the tracer. Finally, the mobility of a functional protein, the transcription termination factor TTF-I, is investigated. Bound in the nucleolus, it is freely mobile in the remainder of the nucleus. The life time of the bound state is about 27 s.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Biologische Grundlagen	3
2.1	Der Zellkern	3
2.1.1	Die Verpackung des Genoms	4
2.1.2	Interphase-Chromosomen	5
2.1.3	Weitere strukturelle Elemente des Kerns	7
2.1.4	Beweglichkeit und Diffusion in Zellen	9
2.2	Das Green Fluorescent Protein GFP und Mutanten	9
2.2.1	Die Struktur von wtGFP und EGFP	9
2.2.2	Molekulare Zustände und Eigenschaften der Fluoreszenz	10
2.2.3	GFP-Varianten und AFPs mit abweichenden spektralen Eigenschaften	12
3	Theoretische Grundlagen	15
3.1	Konfokale Fluoreszenzanregung und -detektion	15
3.1.1	Beleuchtung – Fluoreszenz – Detektion	16
3.1.2	Verschiedene Strahlgeometrien	17
3.1.3	Fokusgröße und räumliche Auflösung	20
3.2	Grundlagen der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	20
3.2.1	Die Korrelationsfunktion einer Spezies	21
3.2.2	Freie Diffusion	22
3.2.3	Vergleich von Auto- und Kreuzkorrelation	24
3.2.4	Triplettkorrektur	25
3.2.5	Berücksichtigung von Photobleaching	27
3.2.6	Korrelation mit Untergrund und Übersprechen	28
3.2.7	Korrelation mehrerer Spezies	29
3.3	Untersuchung von behinderter Diffusion in der FCS	31
3.3.1	Diffusion in statistisch organisierten Systemen	31
3.3.2	Zusätzliche Bindung	34
3.3.3	Einfluss von Grenzflächen	36
3.3.4	Harmonisches Potenzial	39
3.4	Untersuchung von intramolekularen Fluktuationen in der FCS	42
3.4.1	Nichtstrahlende Zustände am Beispiel EGFP	42
3.4.2	Lange Makromoleküle	44
3.5	Andere Methoden der Fluoreszenzfluktuationsspektroskopie	46
3.5.1	Analyse der Photonenverteilung	46
3.5.2	Räumliche Korrelationsspektroskopie	47

3.5.3	Photobleaching-basierte Methoden	47
3.6	Grundlagen der konfokalen Laserscanningmikroskopie	51
3.6.1	Eigenschaften der Abbildung	51
3.6.2	Optisch-mechanische Konzeption eines CLSM	52
4	Das konfokale Fluoreszenzfluktuationsmikroskop	55
4.1	Anforderungsprofil	56
4.2	Konzeption des optischen Strahlengangs	57
4.3	Technische Umsetzung	59
4.3.1	Auslegung der Optik	59
4.3.2	Mechanischer Aufbau	63
4.3.3	Die Elektronik zur Steuerung und Datennahme	63
4.4	Software	65
4.4.1	Das Mikroskopprogramm FFM	65
4.4.2	Analyse der Korrelationsfunktionen	69
5	Justage und Charakterisierung	71
5.1	Konfokale Justage	71
5.2	Charakterisierung	72
5.2.1	Linearität der Galvanometerscanner	72
5.2.2	Abbildungsmaßstab	74
5.2.3	Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Positionierung	74
5.2.4	Auflösung und Transmissionsprofil	75
6	Intrazelluläre Diffusionsmessungen	79
6.1	Beweglichkeit inerter Moleküle im Zellkern	79
6.1.1	EGFP und EGFP- β -Galactosidase in COS-7- und AT-1-Zellen	79
6.1.2	Dextrane in HeLa-Zellen	89
6.1.3	Alexa568 in LCLC-103H-Zellen	93
6.1.4	DsRed in COS-7-Zellen	94
6.2	Bindung und Beweglichkeit funktioneller Proteine im Zellkern	99
6.2.1	Der Transkriptionsterminationsfaktor TTF-I in HeLa-Zellen	99
7	Zusammenfassung	103
	Literaturverzeichnis	105

Abbildungsverzeichnis

2.1	Vereinfachtes Schema einer Zelle	4
2.2	Lehrbuchdarstellung der DNA-Kompaktierung	5
2.3	Schematische Darstellung des Zellkerns	6
2.4	Modelle der Interphasechromosomen	7
2.5	Proteinstruktur von wtGFP	10
2.6	Anregungs- und Emissionsspektren von wtGFP	11
2.7	Struktur, Zustände und Übergänge des wtGFP-Chromophors	12
2.8	Anregungs- und Emissionsspektren verschiedener AFPs	13
3.1	Das konfokale Prinzip	16
3.2	PSF und MDE für verschiedene Strahlgeometrien	19
3.3	Verschiedene theoretische Autokorrelationsfunktionen	24
3.4	Typisches Termschema eines Fluorophors	25
3.5	Simulierte zweidimensionale Random Walks	32
3.6	Freie und behinderte Diffusion	34
3.7	Grenzflächen und Fallen im Fokus	36
3.8	Korrelationsfunktionen bei Diffusion nahe Grenzflächen	38
3.9	Ein- und zweidimensionale Korrelationsfunktionen	39
3.10	Korrelationsfunktionen bei Diffusion in einem harmonischen Potenzial	42
3.11	Vereinfachtes Termschema des EGFP-Chromophors	43
3.12	Diffusion eines langen Makromoleküls	44
3.13	Photobleaching-Zerfallskurve des Fluoreszenzsignals	49
3.14	Das Prinzip des konfokalen Laserscanningmikroskops	52
3.15	Telezentrischer Strahlengang und F-Theta-Objektiv	53
4.1	Strahlengang von Mikroskop, Scanningeinheit und FCS-Modul	58
4.2	Ansicht von Mikroskop, Scanningeinheit und FCS-Modul	59
4.3	Das Scanobjektiv	60
4.4	Die Galvanometerscanner	61
4.5	Konfokale Justage des FCS-Moduls	62
4.6	Nachweiseffizienz der APDs und effektive Transmission der Kanäle	62
4.7	Schaltschema der Steuer- und Messelektronik	64
4.8	Das FFM-Programm	69
5.1	Linearität der Galvanometerscanner	73
5.2	Rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopisches Bild der Referenzprobe	74
5.3	Positioniergenauigkeit und -stabilität	75
5.4	Autokorrelation einer Alexa488-Probe	76
5.5	Laterales Profil von Fokusgröße und Fluoreszenzsignal	77

5.6	Axiales Profil von Diffusionszeit und Fluoreszenzsignal	78
6.1	Plasmidkarten der Vektoren für EGFP- und EGFP-lacZ-Transfektion	80
6.2	Anregungs- und Emissionsspektrum von zellulärem EGFP	81
6.3	pH-Abhängigkeit der EGFP-Fluoreszenz	81
6.4	Normierte Autokorrelation von EGFP in Lösung	82
6.5	Normierte Autokorrelationen von EGFP <i>in vivo</i>	83
6.6	FCS-Scan durch eine EGFP-exprimierende AT-1-Zelle	84
6.7	FCS-Scan durch eine EGFP-exprimierende COS-7-Zelle	85
6.8	FCS-Scan durch eine EGFP- β -gal-exprimierende AT-1-Zelle	86
6.9	FCS-Scan durch eine EGFP- β -gal-exprimierende COS-7-Zelle	87
6.10	FCS-Scan durch einen 10 kDa-Dextrane enthaltenden HeLa-Kern	90
6.11	FCS-Scan durch einen 10 kDa-Dextrane enthaltenden HeLa-Kern	92
6.12	FCS-Scan durch einen 70 kDa-Dextrane enthaltenden HeLa-Kern	93
6.13	Diffusionsbehinderung von Alexa568 als Funktion der H2A-ECFP-Intensität	95
6.14	Plasmidkarte des DsRed-Vektors	95
6.15	FCS-Scan durch eine H2B-EGFP- und DsRed-exprimierende HeLa-Zelle . .	96
6.16	FCS-Scan durch eine H2B-EGFP- und DsRed-exprimierende HeLa-Zelle . .	97
6.17	Plasmidkarte des EGFP-TTF-I-Vektors	100
6.18	FLIP und FCS in einer TTF-I-EGFP-exprimierenden HeLa-Zelle	101

Tabellenverzeichnis

4.1	Die optomechanischen Eigenschaften der M2-Scanner	61
4.2	Die verwendeten Filter und Strahlteiler	63
4.3	Die Grenzen der Bildparameter	67
5.1	Linearität der Galvanometerscanner	73
5.2	Experimentelle und theoretische Parameter des Fokusvolumens	76
6.1	Verhältnis der Diffusionskoeffizienten <i>in vivo</i>	87
6.2	<i>In vivo</i> -Viskositäten und -Anomalieparameter von Dextranen	91

Kapitel 1

Einleitung

Papa arbeitet.
Jule Sophie

Trotz der Erfolge bei der Sequenzaufklärung des Genoms vieler Lebewesen wirft die räumliche Struktur der Erbsubstanz weiterhin zahlreiche Fragen auf. Insbesondere auf einer Größenordnung zwischen ~ 30 und ~ 500 nm gibt es nur wenige experimentelle Hinweise auf die räumliche Organisation *in vivo*. Es hat sich die Auffassung durchgesetzt, dass die Zellkernarchitektur in der Interphase u. a. eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielt. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch zum großen Teil unbekannt.

Alle im Zellkern stattfindenden Prozesse – Transkription der Gene, Replikation der DNA, Reparatur von DNA-Schäden und -Mutationen oder Prozessierung der RNA – erfordern einen effizienten Transport von Molekülen und Komplexen verschiedenster Größen innerhalb des Kerns, in den Kern hinein und aus ihm heraus. Wie beeinflusst die dreidimensionale Organisation des Interphasezellkerns Funktion und Mobilität von Biomolekülen verschiedener Größe und die Zugänglichkeit genomischer Bereiche für sie?

Daneben steht die Frage nach molekularen Wechselwirkungen – Komplexbildung von Proteinen, Protein-DNA-Wechselwirkungen oder Rezeptor-Liganden-Bindungen – im Zentrum vieler biologischer Arbeiten. Eine Charakterisierung in Form des spezifischen Nachweises von Bindungspartnern und der Bestimmung von Bindungskonstanten ist essenziell für das Verständnis biologischer, physikalischer und chemischer Vorgänge in Zellen. Vielfältige Methoden sind dafür entwickelt worden, die oft jedoch für eine *in vivo*-Verwendung nicht geeignet sind. So wird bei vielen Verfahren ein System gezielt gestört und anschließend beobachtet, wie es in ein thermisches Gleichgewicht relaxiert. Außerdem benötigen viele Methoden relativ hohe Konzentrationen und Probenmengen.

Einen Lösungsansatz gerade im Hinblick auf intrazelluläre Anwendungen bietet die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS). Sie beruht auf der Analyse der zeitlichen Teilchenzahlfluktuationen von Molekülen in einem mikroskopischen Beobachtungsvolumen. Ursachen dieser Fluktuationen können Brown'sche Bewegung oder chemische Reaktionen sein. Aus den Amplituden dieser Fluktuationen und dem zeitlichen Verlauf ihrer Korrelationen können makroskopische Größen wie die Teilchenkonzentration und Diffusionskoeffizienten abgeleitet werden: Beispielsweise verweilen große, frei in Lösung befindliche Komplexe länger im Beobachtungsvolumen als kleine und daher schnelle Proteine. Ein Komplex zeigt also länger korrelierte Fluktuationen als seine einzelnen Bausteine. Darüberhinaus ist der zeitliche Verlauf der Fluktuationen direkt mit ihrer Ursache verknüpft: So zeigen Moleküle, deren Mobilität durch statistisch verteilte Hindernisse eingeschränkt wird, eine

zeitabhängige Verzögerung ihrer Bewegung, die anhand der Korrelationen charakterisiert werden kann.

Die Fluktuationen werden nachgewiesen, indem die untersuchten Moleküle in einem mikroskopischen, von einem stark fokussierten Laser beleuchteten Fokus zur Emission angeregt werden. Dies erfordert eine Fluoreszenzmarkierung dieser Moleküle, nutzt aber die hohe Selektivität und Effizienz der Fluoreszenzanregung aus. Damit erschließen sich Teilchenkonzentrationen im nano- und picomolaren Bereich, wie sie oft unter physiologischen Bedingungen vorliegen. Auch andere, die Fluoreszenz beeinflussende Prozesse können zu Signalfluktuations führen und analysiert werden.

Die Verwendung eines konfokalen Strahlengangs und der Optik eines guten Lichtmikroskops ermöglichen Messungen in lebenden Zellen. Viele biologisch relevante Moleküle sind *in vivo* nicht frei beweglich, sondern befinden sich in einem durch ihre Funktion bestimmten Bindungsgleichgewicht. Die Kombination mit einer Scanningeinheit erlaubt es, diese Bindungen zusätzlich räumlich zu charakterisieren und die Struktur möglicher immobilisierter Bindungspartner sichtbar zu machen. Eine zuverlässige und schnelle Positionierung des Fokus relativ zur Probe erreicht man am besten, indem man das Beobachtungsvolumen, wie in der konfokalen Laserscanningmikroskopie üblich, mittels geeigneter optomechanischer Komponenten in der Probe bewegt. Das detektierte Fluoreszenzsignal wird dann mit der Ortsinformation zu einem Bild zusammengefügt.

Eine oft unerwünschte Eigenschaft von Fluoreszenzfarbstoffen ist Photobleaching, d. h. die irreversible photochemische Umwandlung der Farbstoffmoleküle in eine nichtstrahlende Spezies. Diesen Effekt kann man sich aber auch zunutze machen: Sind fluoreszenzmarkierte Moleküle nur teilweise gebunden, so unterscheiden sich die Aufenthaltsdauern der gebundenen und der beweglichen Fraktion und damit auch die Wahrscheinlichkeit des Ausbleichens wesentlich. Mit dem zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals können daher die jeweiligen Anteile und ihr Austausch analysiert werden.

Die zu untersuchenden Moleküle weisen i. a. nur schwache intrinsische Fluoreszenz auf, so dass sie durch geeignete biochemische Reaktionen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden müssen. Außerdem ist es möglich, autofluoreszierende Proteindomänen mit gentechnischen Methoden an zu untersuchende Proteine zu koppeln und so ein *in vivo*-Fluoreszenzsignal zu erhalten. Dieses kann dann in lebenden Zellen nahezu störungsfrei für die genannten Methoden verwendet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des dreidimensionalen Aufbaus des Zellkerns auf molekulare Mobilität zu untersuchen. Dazu wurden die genannten Methoden zur Fluoreszenzfluktuationsmikroskopie (FFM) zusammengeführt. Die biologischen Grundlagen, die diese Arbeit motivieren, sind in Kapitel 2 dargestellt. Die theoretischen Grundlagen der FCS wurden erweitert und auf intrazelluläre Anwendungen angepasst (Kapitel 3), da die experimentellen Bedingungen in einer Zelle i. a. sehr heterogen und nichtideal sind. Der bestehende experimentelle FCS-Aufbau wurde um eine Scanningeinheit erweitert, um hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie mit orts aufgelöster FCS zu verbinden. Kapitel 4 beschreibt Auslegung und Aufbau des Experiments. Dessen Charakteristika werden in Kapitel 5 dargestellt, während in Kapitel 6 intrazelluläre Beweglichkeitsmessungen beschrieben und diskutiert werden.

Kapitel 2

Biologische Grundlagen

2.1 Der Zellkern

Die Zelle ist die kleinste biologische Einheit, die alle Kriterien des Lebens wie Stoffwechsel, Wachstum, Fortpflanzung, Reizbarkeit und Fortbewegung erfüllt. Höhere Lebewesen wie Pflanzen und Tiere (Eukaryonten) bestehen aus zahllosen Zellen, die sich sehr vielfältig ausdifferenziert haben. Ihre Form und Funktion wird durch die Aufgabe bestimmt, die sie – oft im Verband mit anderen Zellen – zu erfüllen haben. Jedoch besitzen alle Zellen grundlegende gemeinsame Merkmale, deren auffälligstes die Unterscheidung zwischen dem Zellkern (Nukleus, 6–10 % des Zellvolumens) und dem umgebenden Zytoplasma ist (Abb. 2.1).

Die Aufgaben des Zellkerns lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

- Sichere Speicherung des Trägers der genetischen Information, des Genoms, in Form mehrerer DNA-Moleküle. Dazu gehören eine schützende, hoch kompaktierende Verpackung und die Reparatur von Schäden, die durch mechanische, biochemische oder Strahlungseinwirkung entstehen.
- Kontrollierte Vervielfältigung des Genoms (Replikation).
- Reguliertes Ablesen des genetischen Codes (Transkription) und Übertragung auf das primäre Genprodukt, die RNA.
- Bearbeitung der primären Genprodukte (RNA-Prozessierung und -Spleißen).
- Strukturelle Umorganisation zur Zellteilung.

Umgeben ist der Zellkern von einer Kernhülle, die wie alle biologischen Membranen aus einer Phospholipid-Doppelschicht besteht. Die Kernhülle bildet eine topologische Einheit mit dem Membransystem des endoplasmatischen Retikulums (ER), das das gesamte Zytoplasma durchziehen kann und teilweise mit Ribosomen belegt ist (rauhes ER, rER). Ribosomen bestehen aus RNA-Protein-Komplexen und sind die Orte der Proteinbiosynthese. Durch Abschnürungen des ER können membranumschlossene Vesikel entstehen, die zur Speicherung oder Sekretion bestimmte Enzyme und Hormone enthalten können. Ein System aus gestapelten Membranvesikeln, der Golgi-Apparat, ist für den Transport dieser Makromoleküle in Speichervesikel (Lysosomen, Peroxisomen) oder aus der Zelle hinaus verantwortlich (sekretorische Vesikel). Darüberhinaus gibt es membranumschlossene Organellen wie die Mitochondrien, in denen die universellen zellulären Energieträger, die

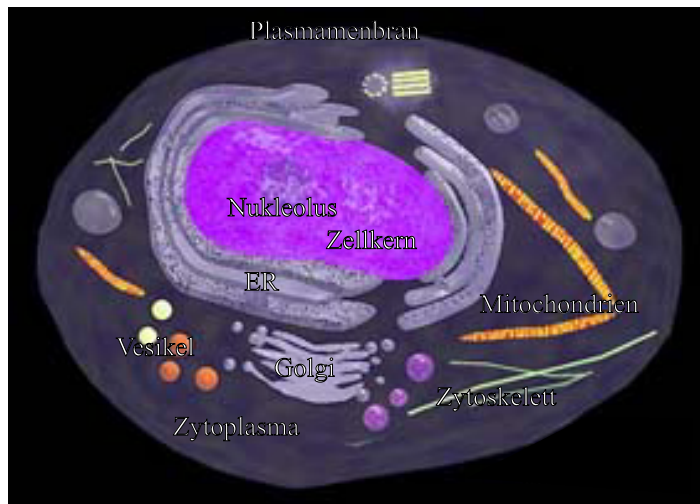


Abbildung 2.1: Vereinfachtes Schema einer höheren tierischen Zelle nach [148].

Nukleotidtriphosphate, unter Verbrauch von Fett- und Kohlenhydrate-Abbauprodukten synthetisiert werden. Die gesamte Zelle ist von einer Plasmamembran umgeben und wird mechanisch durch ein Zytoskelett stabilisiert, das aus dynamisch organisierten Intermediärfilamenten besteht.

2.1.1 Die Verpackung des Genoms

Die genetische Information ist auf langen Polymermolekülen gespeichert, der Desoxyribonukleinsäure (DNA), die *in vivo* Doppelhelizes aus zwei gegenläufigen Einzelsträngen bilden. Die Codierung erfolgt dabei mit Hilfe der Monomere, die eine der Basen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C) enthalten und jeweils einen spezifischen Bindungspartner (A-T, G-C) am komplementären Strang haben. Im Genom einer menschlichen Zelle sind ca. 33 000 Gene auf mehr als $6 \cdot 10^9$ Basenpaare (bp) in 46 einzelnen DNA-Molekülen verteilt. Diese sog. Chromosomen haben eine Gesamtlänge von über 2 m, so dass bei einem typischen Zellkernradius von $10 \mu\text{m}$ schon aus geometrischen Gründen eine äußerst kompakte Verpackung erforderlich ist (Abb. 2.2).

Nukleosomen: Der erste Kompaktierungsschritt erfolgt, indem die DNA 1,8 mal um ein Proteinoktamer gewickelt wird. Die dafür notwendigen 146 bp ergeben zusammen mit einem Zwischenstück, der Linker-DNA, eine durchschnittliche Wiederholungslänge von 200 bp, auf denen ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird. Ein solches Nukleosom besteht aus je zwei Kopien von vier evolutionär hochkonservierten Proteinen, den Histonen H2A, H2B, H3 und H4.

Chromatin: Auf noch ungeklärte, mehr oder weniger regelmäßige Weise werden die Nukleosomen zu einer Fiber von 30 nm Durchmesser aufgewickelt [53, 163], dabei sind das Histon H1 und weitere chromosomale Nicht-Histon-Proteine beteiligt und möglicherweise für unterschiedliche Kompaktierungsgrade verantwortlich. Das gleiche gilt für reversible Modifizierungen der nukleosomalen Histone (z. B. Acetylierung). Der Kompaktierungsgrad des Chromatins beeinflusst auch die Zugänglichkeit genetischer Bereiche für Transkriptionskomplexe, und in der lebenden Zelle kommt die DNA auch in allen bisher beschriebenen Zuständen vor. Chromatin lässt sich daher in kompaktes Heterochromatin mit wenigen bzw. inaktiven Genen und lockerer gepacktes, genreicheres Euchromatin einteilen.

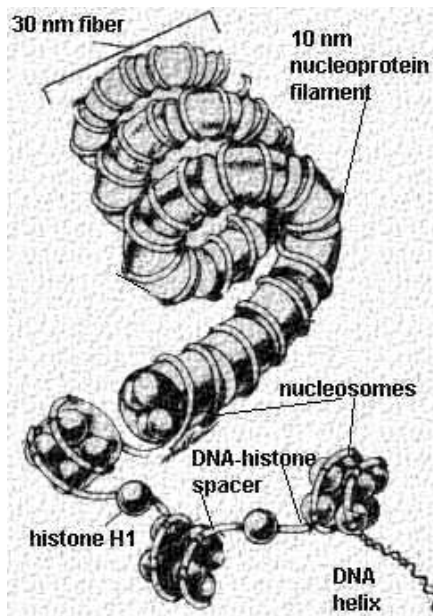


Abbildung 2.2: *Lehrbuchdarstellung der DNA-Kompaktierung mit dem Solenoidmodell der 30 nm-Fiber [3].*

Chromosomen: Die nächsthöhere Organisationsform findet auf der Ebene ganzer Chromosomen statt, die zellzyklusabhängig ihre Struktur wesentlich ändern: Während der Zellteilung (Pro-, Meta-, Ana- und Telophase) sind sie hochkondensiert und im Lichtmikroskop erkennbar. Zur Interphase (G1-, S- und G2-Phase) decondensieren sie und verteilen sich im Zellkern auf bis heute nicht vollständig geklärte Weise. Die dreidimensionale Organisation der Chromosomen im Interphasezellkern erfüllt Funktionen der Genregulation und wird im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

2.1.2 Interphase-Chromosomen

Im Gegensatz zur Basensequenz und der Chromatinstruktur ist die dreidimensionale Organisation der Chromosomen in der Interphase noch recht unbekannt. In einer Vielzahl von Untersuchungen konnten jedoch einige Eigenschaften beobachtet und bestätigt werden, die im Rahmen phänomenologischer und quantitativer Modelle einzuordnen sind.

Experimentelle Beobachtungen

Die Chromosomen besetzen begrenzte und nur gering überlappende Teilvolumen des Kerns [33, 171], chromosomale Domänen bzw. Territorien (CT). Ob Korrelationen der Positionen der Territorien (z. B. von homologen Chromosomen) untereinander oder mit Parametern wie der Gendichte bestehen, bleibt ungeklärt [32].

Eine Färbemethode mitotischer Chromosomen macht ein Bandenmuster sichtbar, das auch im decondensierten Zustand chromosomaler Territorien erhalten bleibt. G-C-reiche, lockerer organisierte sog. R-Banden werden früh in der S-Phase repliziert und sind genreich, während A-T-reiche, kompaktere G-Banden sich durch eine geringe Gendichte auszeichnen und eher später repliziert werden [3]. An der Peripherie des Kerns (mit Ausnahme von Kernporen) und des Nukleolus befindet sich vorwiegend kompakteres Heterochromatin, ansonsten sind deutliche Variationen der Chromatindichte überall im Kern zu beobachten (Abb. 2.3).

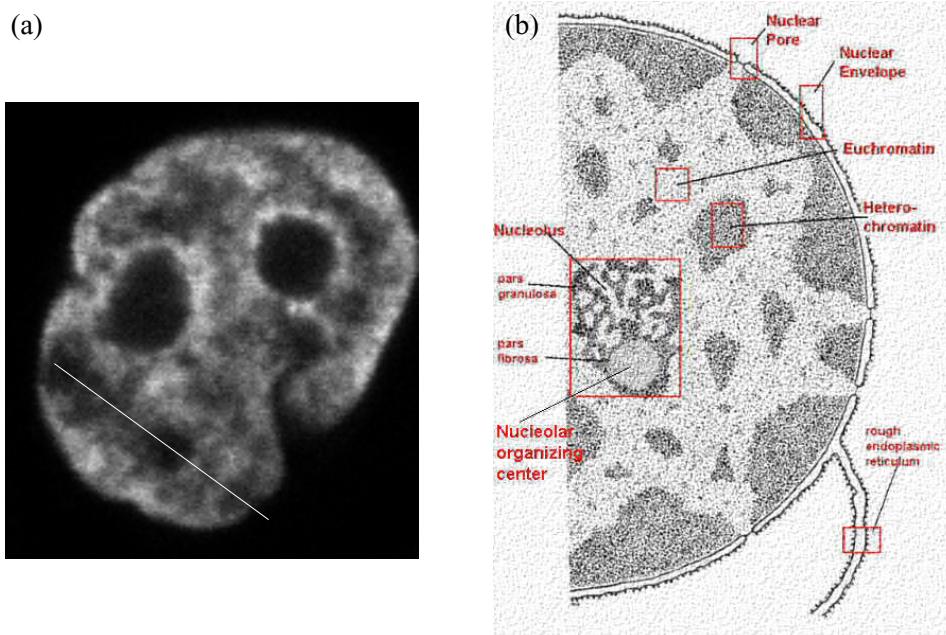


Abbildung 2.3: (a) Konfokales Fluoreszenzbild des Kerns einer EGFP-H2B-exprimierenden HeLa-Zelle (der markierte Streifen unten ist durch einen FCS-Scan ausgebleicht worden), (b) Schematische Darstellung des Zellkerns nach [3].

Unterhalb ganzer Chromosomen werden Strukturen von ~ 1 Mbp genomischer Länge und ~ 400 – 800 nm Durchmesser beobachtet, die abgesehen von eingeschränkter Brown'scher Bewegung räumlich und zeitlich recht gut erhalten bleiben [170] und auch als jeweils gleichzeitig replizierter Bereich betrachtet werden können [75]. Die chromosomalen Arme zeigen in der Interphase nur geringe Überlappung [91].

Neben der Replikation scheint auch die Transkription trotz widersprüchlicher Beobachtungen an vielen Positionen gleichzeitig und vor allem in Bereichen geringerer Chromatindichte stattzufinden [155]. Die lokale Kompaktierung scheint dabei den Zeitpunkt der Replikation und die Wahrscheinlichkeit der Transkription zu bestimmen.

Daraus entwickelte Modelle

Auf Grundlage der Experimente postuliert das ICD- (interchromosomal domain) bzw. CT-IC-Modell (chromosome territory – interchromosomal space, Abb. 2.4 a) [33, 32] eine Oberfläche der chromosomalen Territorien, was die Existenz eines „Zwischenraums“ impliziert. Genregulation erfolgt dann über die Zugänglichkeit für Transkriptionskomplexe von codierenden und regulatorischen Elementen, die im Falle aktiver Gene dem ICD-Raum zugewandt sind. Kleine Moleküle hingegen können in CT eindringen. Der ICD-Raum besitzt eine komplizierte Struktur, die von großen Volumina bis zu engen Kanälen von wenigen nm Durchmesser reicht. Die Topologie muss in ausdifferenzierten Zellen für ein gewünschtes Muster an aktiven und reprimierten Genen erhalten bleiben. Der ICD-Raum ist der Ort für alle weiteren Aktivitäten wie RNA-Spleißen oder Transportprozesse.

Einen quantitativen Ansatz stellt das MLS-Modell (multiloop subcompartment) dar, das die Faltung von ~ 1 Mbp langen Bereichen der 30 nm-Fiber zu Rosetten aus ~ 120 kbp großen Schleifen annimmt [92]. Ein Chromosom besteht aus mit kurzen Chromatinstücken

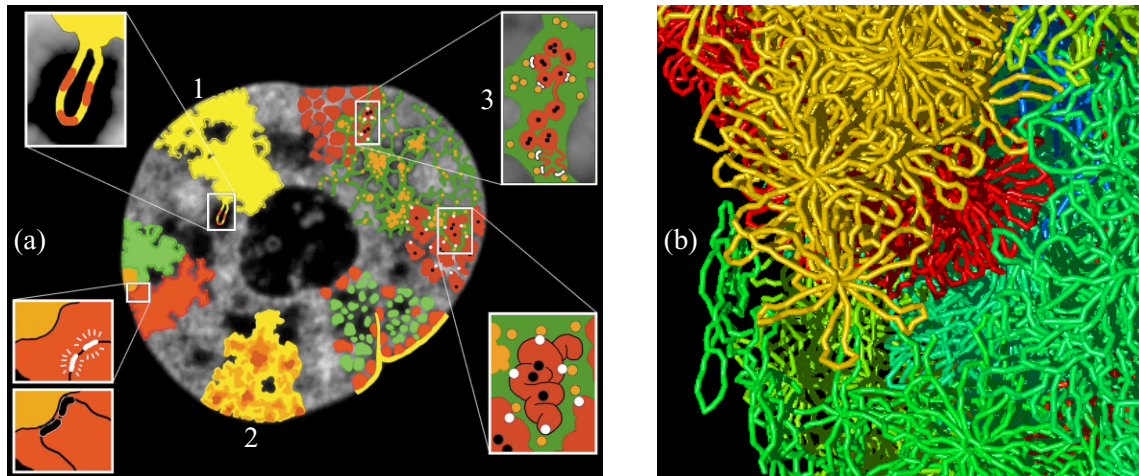


Abbildung 2.4: Modelle der Interphasechromosomen: (a) CT-IC- oder ICD-Modell nach [32], 1 – Oberfläche eines CT, 2 – Variationen der Chromatindichte, 3 – mitotischen Banden entsprechende subchromosomale Strukturen (rot) mit aktiven (weiß) und inaktiven Genen (schwarz) und deren Lage zum ICD-Raum (grün), (b) Peripherie eines simulierten Kerns nach dem MLS-Modell, verschiedene Farben markieren verschiedene Chromosomen, die aus der in Rosetten gefalteten 30 nm-Fiber bestehen (Größen maßstäblich, T. A. Knoch, Abt. Biophysik der Makromoleküle, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) [92, 91].

verknüpften Rosetten. Die Simulation von Chromosomen und ganzen Kernen ergibt Variationen der Chromatindichte sowie die Erhaltung von CT und subchromosomalen Strukturen, in Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen [91]. Sich im Kern bewegend Moleküle und Komplexe nehmen die Chromatinfiber als mehr oder weniger dichtes Netzwerk von Hindernissen wahr, wobei zwischen intra- und interchromosomalen Bereichen kein qualitativer Unterschied besteht (Abb. 2.4 b).

2.1.3 Weitere strukturelle Elemente des Kerns

Nukleolus: Nukleoli (dunkle zentrale Bereiche in Abb. 2.3 a, 2.4 a und markiert in Abb. 2.3 b) sind die auffälligsten Kompartimente von Zellkernen [3, 133, 23, 25]. Sehr dynamisch organisiert, sind sie die Orte der Synthese der Ribosomenuntereinheiten. Für ribosomale RNA (rRNA) codierende Gene befinden sich beim Menschen auf 10 Chromosomen in Form von zahlreichen geclusterten Kopien mit dazwischenliegenden nichtcodierenden Sequenzen (tandem repeats). Sie bilden die kompakten Nukleolusorganisatoren im fibrillären Zentrum (FC). Die Transkription erfolgt vermutlich am Übergang zwischen dem FC und der dichten fibrillären Komponente (DFC). Die dort synthetisierten rRNA-Vorläufer binden aus dem Zytoplasma in den Kern transportierte ribosomale Proteine und kleine ribosomale RNAs (snoRNA) und werden prozessiert, wobei die Ribosomenuntereinheiten entstehen. Während dieses Vorgangs wandern die Komplexe aus der DFC an die Peripherie in die lockerer aufgebaute granuläre Komponente (GC). Durch aktiven Kernporentransport werden sie in das Zytoplasma verbracht, wo sie zu fertigen Ribosomen reifen. Strukturell auffällig ist an den Nukleoli, dass spezifische Makromoleküle sich dort anreichern, obwohl keine begrenzende Membran existiert. Daher scheint die Lokalisierung nur

durch lokal konzentrierte Bindungsstellen zustande zu kommen. Während der Zellteilung stoppt die Transkription, und die Nukleoli lösen sich auf. Nach der Telophase bilden sich an den 10 Nukleolusorganisatoren kleine Vorläufer, die zu einem oder wenigen Nukleoli verschmelzen. Ob auch Strukturproteine oder ob nur Bindungen funktioneller Proteine selbstorganisiert am Aufbau beteiligt sind, ist noch ungeklärt.

Speckles und Kernkörper: Neben dem Nukleolus und dem Chromatin befinden sich im Zellkern viele kleine Körper, die zum Teil schon lange bekannt sind, deren Funktion aber noch recht unklar ist [83]. Dazu gehören Coiled oder Cajal Bodies (CB, vermutlich an der Reifung von stabilen kleinen RNA-Protein-Komplexen, snRNPs¹, beteiligt), PML Bodies (vermutlich in Transkriptionsregulation involviert), Perichromatinfibrillen (fibrilläre Strukturen aus heterogen angesammelten, neu synthetisierten RNA-Molekülen) und Interchromatin Granule Cluster (IGC, Akkumulation von Spleißfaktoren).

Kernmembran und Kernporen: Die Doppelmembran der Kernhülle umgibt den Zellkern und trennt ihn damit topologisch vom Zytoplasma. Sie ist von zahlreichen Kernporenkomplexen (NPCs) durchzogen, über die der aktive und spezifische Transport von Proteinen und Nukleinsäuren in den und aus dem Kern stattfindet [146]. Dieser Komplex besteht aus ~ 100 statisch und dynamisch eingebauten Proteinen (Nukleoporine) und besitzt einen ringförmigen membranständigen, einen fibrillären zytoplasmatischen und einen korbähnlichen kernseitigen Teil. Der freie Durchmesser der Pore beträgt ~ 9 nm, so dass kleine Moleküle diffusiv hindurchtreten können. Größere Moleküle und Komplexe müssen eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) oder Kernexportsequenz (NES) besitzen, um von Import- und Exportproteinen (Importin-, Exportin) gebunden zu werden. Nur dann kann der Transport unter GTP-Hydrolyse erfolgen [2].

Lamina und Kernmatrix: Die Kernhülle ist während der Interphase auf der Innenseite mit einem stabilisierenden Netzwerk aus Intermediärfilamenten ausgekleidet, der Lamina [147]. Die Filamentproteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Lamin A und B), die sich in ihrer Struktur und ihrem Polymerisierungsverhalten beim Aufbau der Kernhülle unterscheiden [89]. Während der Zellteilung befinden sie sich beweglich und in mono- oder oligomerer Form in der ganzen Zelle, danach bauen sie zusammen mit Membranen und Kernporen die Kernhülle wieder auf. Sie sind stabil über membranständige Proteine mit der Hülle verknüpft, und es gibt Hinweise, dass auch Chromatin über vermittelnde Proteine an die Lamina gebunden sein könnte [50, 147].

Auch innerhalb des Interphasekerns werden Lamine gefunden, vor allem in Form von globulären Aggregaten, die am Aufbau einer Kernmatrix beteiligt sein, aber auch nur als Reservoir für die Lamina dienen könnten. Auf jeden Fall stehen sie mit Replikationskomplexen räumlich und funktionell in Verbindung [147].

Die Existenz einer dem Zytoskelett vergleichbaren Kernmatrix ist weithin kontrovers [107, 108, 95], insbesondere da die beteiligten Makromoleküle (Proteine ebenso wie RNA) noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Außerdem erfordern bestehende Modelle des Interphasezellkerns (s. o.) kein solches Gerüst, nicht zuletzt weil nichtcodierende Sequenzen des Genoms strukturelle Funktionen übernehmen können.

¹snRNPs spielen bei der Prozessierung von RNA eine Rolle

2.1.4 Beweglichkeit und Diffusion in Zellen

Die Entwicklung von vor allem fluoreszenzbasierten Methoden (FCS, FRAP oder FLIP) zur Untersuchung molekularer Beweglichkeiten und Bindungen hat zu einer rasanten Zunahme von Experimenten in lebenden Zellen geführt. Während FRAP und FLIP bereits für nur zum Teil quantitative Analysen verwendet wird, hat die Verwendung von FCS als sensitiveres Verfahren noch viel methodische Entwicklung erfordert [17, 18, 138, 46].

Die hydrodynamischen Eigenschaften des Zytoplasmas sind bisher am ausführlichsten untersucht worden, in erster Linie mit Photobleaching-basierten Methoden [79, 77, 78, 61, 76, 149, 150, 141]: Abgesehen von enthaltenen Organellen, z. B. Mitochondrien [104], besteht das Zytoplasma aus einer im Vergleich zu typischen Proteinen groben Matrix, umgeben von kleinen und von Makromolekülen in einer flüssigen Phase. Letztere erscheinen für kleine Moleküle als Hindernisse, für größere tragen sie zur Viskosität bei, die insgesamt etwa 2,5–10fach höher als die von Wasser ist.

Aus bisherigen Messungen der Beweglichkeit im Zellkern [162, 141, 118, 117, 80], die auch Inhalt dieser Arbeit sind, kann abgeleitet werden, dass die Bewegung inerte Moleküle auch im Kern durch Diffusion zustande kommt. Zahlreiche funktionelle Proteine hingegen stehen in einem Bindungsgleichgewicht, und der ungebundene Anteil ist frei beweglich [1, 115, 87]. Moleküle wie z. B. Transkriptionsfaktoren scheinen den Kern diffusiv nach potenziellen Bindungspartnern „abzuscannen“, und viele im Mikroskop statisch anmutende Strukturen, die eine starke Lokalisierung bestimmter Moleküle aufweisen, sind sehr viel dynamischer aufgebaut [86]. Eine ausführliche Betrachtung des Einflusses der Kernarchitektur auf die Beweglichkeit steht noch aus. Diffusion ist ein verbreiteter, da schneller und effizienter Transportprozess.

2.2 Das Green Fluorescent Protein GFP und Mutanten

Der Wildtyp des grün fluoreszierenden Proteins wtGFP (green fluorescent protein) entstammt der nordpazifischen Qualle *Aequorea victoria* und wandelt in diesem Organismus das blaue Licht des chemilumineszenten Proteins Aequorin in grüne Fluoreszenz um [154]. Obwohl es weitere autofluoreszierende Proteine (AFPs) aus anderen Organismen gibt, ist GFP mit Abstand am besten charakterisiert. Neben der Primär- bis Quartärstruktur sind die spektralen Eigenschaften und die am gesamten Fluoreszenzprozess beteiligten elektronischen und Konformationszustände ausführlich untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens in anderen Organismen ebenfalls fluoreszente Moleküle erzeugt, ohne dass *Aequorea*-spezifische Enzyme erforderlich sind. Durch Mutation bestimmter Aminosäuren konnten die spektralen Eigenschaften von GFP verändert werden. Darüberhinaus wurde in der indopazifischen Seeanemone *Discosoma striata* ein rot fluoreszierendes Protein von nur ca. 25 % Sequenzhomologie, aber sehr ähnlicher Struktur entdeckt, das das Spektrum der verfügbaren AFPs deutlich erweitert. Die Konstruktion von Chimären bestimmter Proteine mit AFPs findet in Kombination mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden zunehmende Verwendung in der Molekular- und Zellbiologie [38, 172].

2.2.1 Die Struktur von wtGFP und EGFP

Das wtGFP und die in dieser Arbeit vorwiegend verwendete Mutante EGFP (F64L, S65T) [28] bestehen aus 238 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 27 kDa. Es bildet sich eine zylindrische Struktur von ca. 3 nm Durchmesser und 4 nm Höhe aus 11 β -Strängen so-

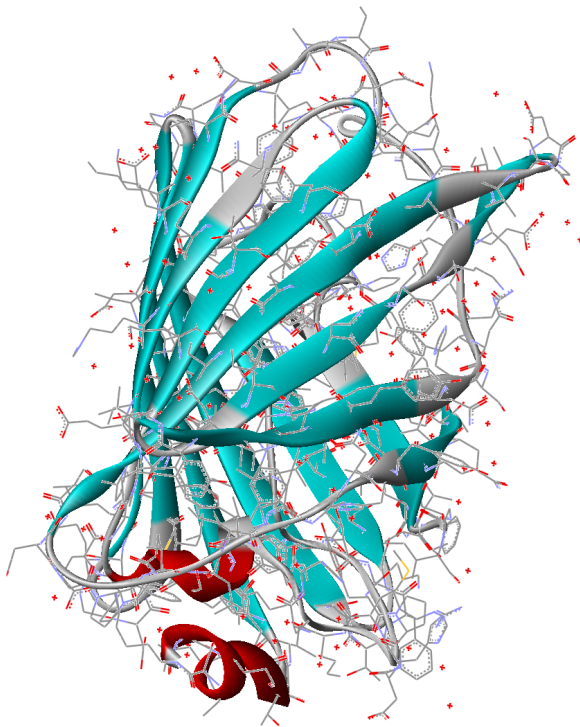


Abbildung 2.5: *Proteinstruktur von wtGFP: Rote Bänder stehen für α -Helizes, blaue für β -Faltblätter und Stäbchen für kovalente Bindungen. Man erkennt die zylindrische Struktur, in deren Mitte der Chromophor eingebettet ist.*

wie zwei α -Helizes unterhalb und eine innerhalb des Zylinders aus, siehe Abb. 2.5. Der Chromophor, grün markiert in Abb. 2.7 a, ist durch zahlreiche Wasserstoffbrücken geschützt in das Zentrum des Zylinders eingebettet. Er besteht aus dem aromatischen Ring des Tyr66 und einer zyklischen Struktur, die autokatalytisch aus der Carboxylgruppe von Ser65 und der Aminogruppe des Gly67 entsteht. Durch anschließende Oxidation und die Bindung einiger räumlich naher, aber in der Sequenz entfernter Aminosäuren über Wasserstoffbrücken geht das Molekül in die fluoreszente Konfiguration über. Die Mutante EGFP kennzeichnet eine effizientere Faltung bei 37° C, was der Mutation F64L zugeordnet wird, und veränderte spektrale Eigenschaften durch Thr65 [154].

Unter physiologischen Bedingungen scheinen wtGFP und EGFP als Monomer vorzuliegen und sehr stabil gegen Temperatur- und pH-Änderungen, Proteaseaktivität und Detergenzien zu sein. Der Diffusionskoeffizient beträgt bei Raumtemperatur in wässriger Lösung $8,7 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, dies entspricht einem hydrodynamischen Radius von 2,82 nm [151].

2.2.2 Molekulare Zustände und Eigenschaften der Fluoreszenz

Das Absorptions- und das Fluoreszenzanregungsspektrum von wtGFP zeigen Maxima bei ca. 395 und 475 nm, deren Verhältnis sich mit zunehmendem pH zugunsten des längerwelligeren Peaks verschiebt, wie in Abb. 2.6 a dargestellt [151, 54]. Das Emissionsspektrum ist nahezu unabhängig von der Anregungswellenlänge und zeigt eine der Anregung entsprechende pH-Abhängigkeit. EGFP weist ein sehr ähnliches Absorptions- und Emissionsverhalten auf, jedoch verschwindet das Anregungsmaximum bei 395 nm [65]. Interpretiert man den Einfluss des pH als Protonierungsgleichgewicht, erhält man einen pK_a -Wert von ca. 6 [98, 65].

Die zeitaufgelöste Beobachtung der Fluoreszenz einzelner immobilisierter Moleküle [116,

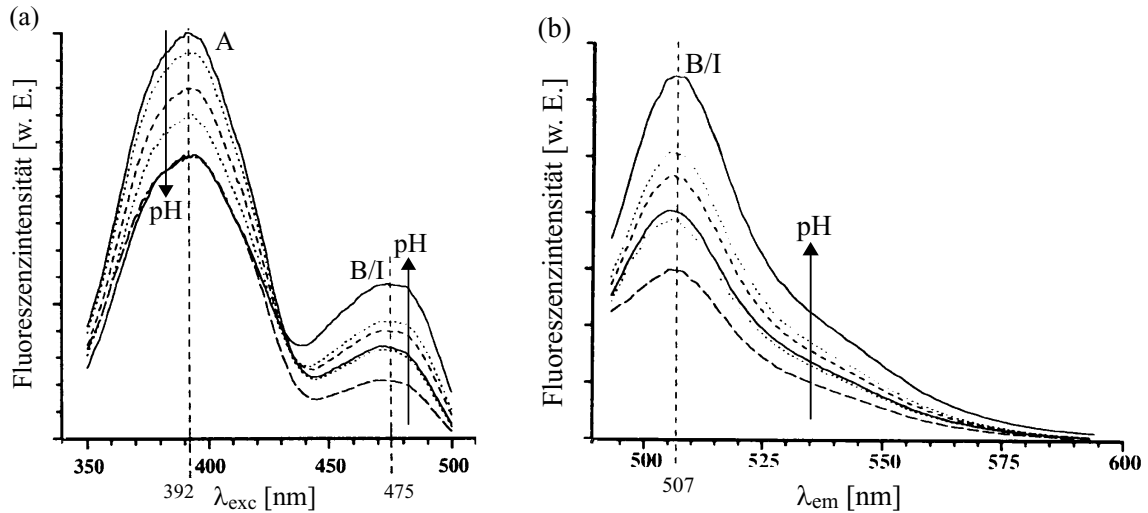


Abbildung 2.6: (a) Anregungsspektren bei einer Emissionswellenlänge von 507 nm von wtGFP und (b) Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm von wtGFP und EGFP in Abhängigkeit vom pH-Wert aus [151]. Die Pfeile zeigen die Veränderungen bei zunehmendem pH an, und die Maxima sind mit den beteiligten Konfigurationen gekennzeichnet.

36, 44, 43] und FCS-Messungen von EGFP in Lösung [54] unter Anregung mit 488 nm zeigen darüber hinaus ein Blinken oder Flackern einzelner Moleküle mit An- und Auszeiten zwischen wenigen ms und einigen s.

Aus diesen Ergebnissen, weiteren spektroskopischen Studien und aus der Proteinstruktur ist folgendes Modell entwickelt worden [24, 16, 99, 30, 157]: Zwischen den Konformationen A und B des wtGFP, die sich in der Protonierung des Chromophors und ihrer räumlichen Konfiguration unterscheiden, stellt sich ein Gleichgewicht ein (Abb. 2.7). Zustand A wird mit ca. 395 nm angeregt und kann bei Emission um 430 nm strahlend zerfallen. Sehr viel schneller ist jedoch die Umlagerung eines Protons (~ 10 ps), so dass der angeregte Intermediärzustand I* entsteht. Dieser kann strahlend mit ca. 508 nm in seinen Grundzustand I oder strahlungslos durch Relaxation der Konfiguration in B bzw. durch Reprotonierung in A übergehen. B wird mit ca. 477 nm angeregt und zerfällt dann entweder unter Emission von Licht oberhalb von 500 nm oder geht strahlungslos in I über. Dessen Anregung erfolgt mit 495 nm.

Die dunkelgrün markierte Restgruppe in Abb. 2.7 a, im wtGFP nur ein H-Atom, wird durch die S65T-Mutation des EGFP durch eine Methylgruppe ersetzt. Dies führt zu einer sterischen Bevorzugung der deprotonierten Konfiguration B, die sich von I spektral und in der Konformation weniger deutlich unterscheidet als A. Daher fallen die Anregungsmaxima bei 488 nm nahezu zusammen.

Befindet sich das Molekül in Lösung, so kann die Protonierung alternativ durch H^+ -Ionen der Flüssigkeit erfolgen. Dies führt zur beobachteten pH-Abhängigkeit der Spektren. Konformationsfluktuationen zwischen A und B im Grundzustand können das Blinken erklären, da bei Anregung um 488 nm nur I und B angeregt werden können. Geht das Molekül in A über oder wird durch ein H^+ -Ion protoniert, bleibt es solange „unsichtbar“, bis es durch thermische Fluktuationen wieder Zustand I einnimmt.

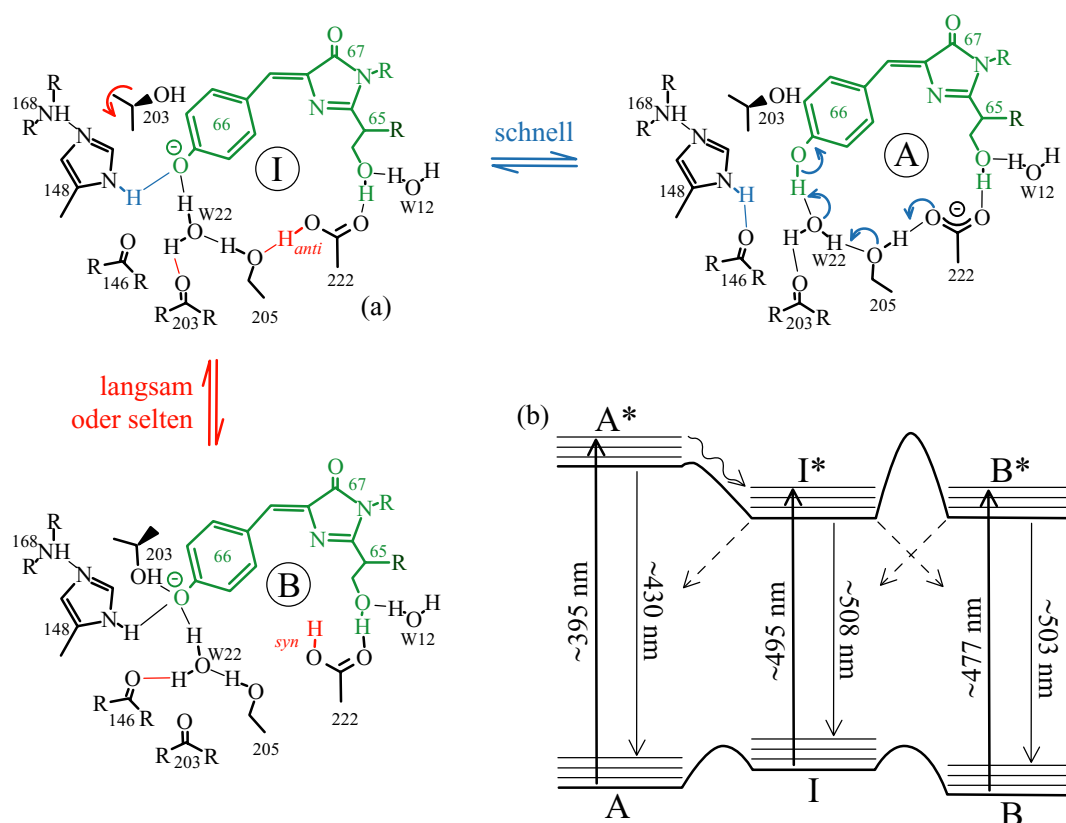


Abbildung 2.7: (a) Mögliche Struktur des wtGFP-Chromophor in den verschiedenen Zuständen nach [16]. Kovalente Bindungen sind dick, Wasserstoffbrücken dünn gezeichnet. A ist der im wtGFP dominierende Zustand, B die im EGFP am häufigsten anzutreffende Konfiguration, I der Intermediärzustand. Der Chromophor ist in grün, Veränderungen beim Übergang von A nach I sind in blau und von I nach B in rot markiert. (b) Mögliches Zustandsschema nach [30]: Dick gezeichnete Übergänge entsprechen der Anregung, dünne durchgezogene dem strahlenden Zerfall und gestrichelte dem strahlungslosen Übergang sowie die Schlangenlinie dem photoinduzierten Übergang $A^* \rightarrow I^*$. Die Wellenlängen geben die ungefähren Werte bei Raumtemperatur an.

2.2.3 GFP-Varianten und AFPs mit abweichenden spektralen Eigenschaften

Neben der am häufigsten verwendeten Variante mit der Mutation S65T (z. B. EGFP) existieren weitere spektral veränderte Varianten, deren Anregungs- und Emissionsspektren Abb. 2.8 zeigt. Einen nützlichen Überblick über die Fluoreszenzeigenschaften gibt [105].

Yellow fluorescent protein YFP: Die Mutationen S65G und S72A und eine der Alternativen T203F, T203H oder T203Y ergeben zwei gestapelte aromatische Ringe, deren mesomeres π -Elektronensystem zu einem Anregungspeak bei 512 nm und einer maximalen Emission um 525 nm führt. Auch hier kann ein Ionisierungs- bzw. Protonierungsgleichgewicht des Chromophors in einer pH-Abhängigkeit der Spektren und in Blinken resultieren [31, 139]. Ein Beispiel ist EYFP (S65G, V68L, S72A, T203Y) [28].

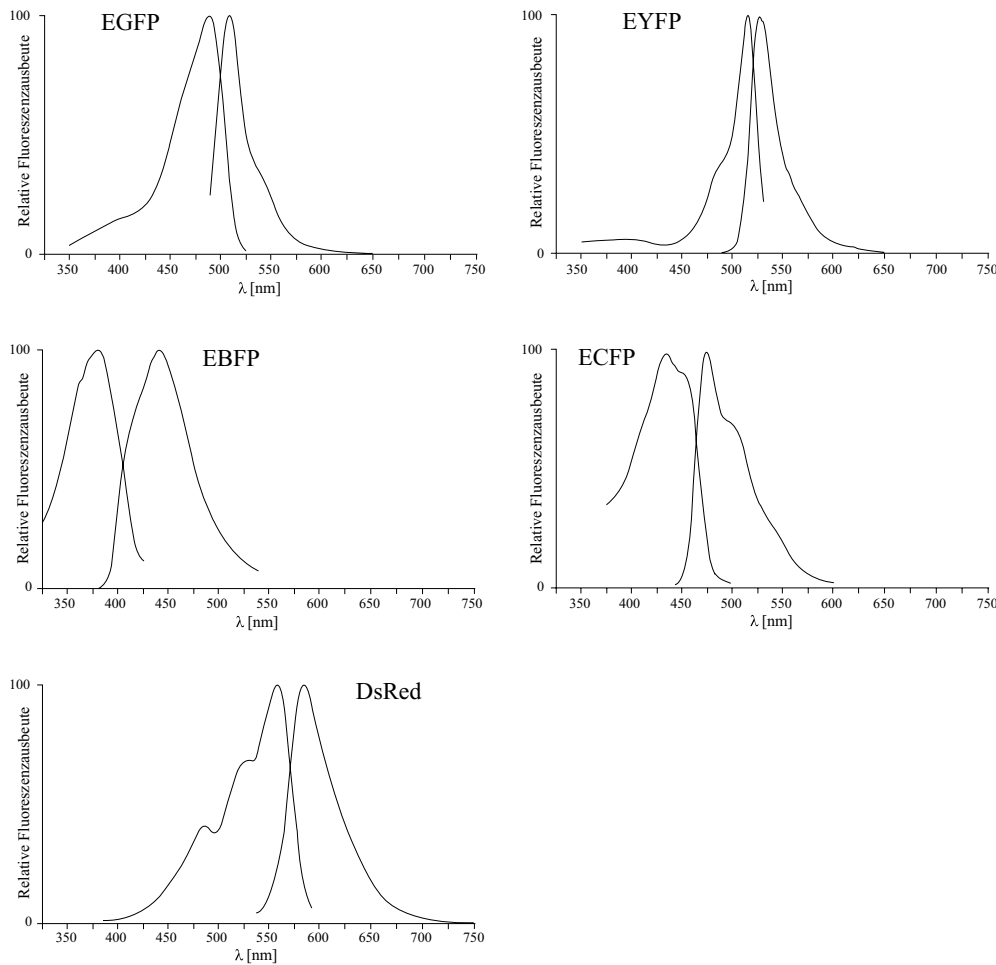


Abbildung 2.8: Die normierten Anregungs- und Emissionsspektren von verschiedenen GFP-Mutanten und von DsRed nach [105]. Anregungsspektren wurden mit Detektion im Maximum der Emissionsspektren aufgenommen und umgekehrt.

Cyan fluorescent protein CFP: Die entscheidende Mutation dieser Variante ist Y66W, der Tyr-Ring wird durch den Doppelring des Trp ersetzt, z. B. bei ECFP (F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A) [28]. Eine zum wtGFP analoge Chromophorprotonierung legt die Struktur nicht nahe. Die maximale Anregung liegt bei ca. 435 nm, die maximale Emission um 480–490 nm.

Blue fluorescent protein BFP: Um ein Anregungsmaximum bei 382 nm und einen Emissionspeak bei 440 nm zu erhalten, ist Tyr66 durch His ersetzt worden (Y66H). Auch hier scheint eine zum wtGFP analoge Chromophorprotonierung unwahrscheinlich. Ein Beispiel ist EBFP (F64L, Y66H, Y145F) [28].

Red fluorescent protein DsRed: Das in *Discosoma striata* entdeckte rot fluoreszierende Protein DsRed [84, 28] (225 Aminosäuren, 25,9 kDa) besitzt einen den GFP-Mutanten sehr ähnlichen Chromophor Gln-Tyr-Gly (66–68), d. h. der für die Fluoreszenz notwendige Tyr-Ring und das für die Zyklisierung erforderliche Gly sind erhalten. Die Umgebung

scheint sich jedoch deutlich von wtGFP zu unterscheiden [159, 168], so dass ein Absorptionsmaximum bei 558 nm und eine maximale Emission um 583 nm möglich wird. Auch in DsRed ist ein Gleichgewicht von Zuständen unterschiedlicher Fluoreszenzeigenschaften beobachtet worden, das deutlich von der Beleuchtungsintensität, aber nur schwach vom pH abhängt [56]. Es ist nicht geklärt, wie der Chromophor nach der Translation gebildet wird [49]. Einer zellbiologischen Verwendung steht (noch) entgegen, dass die Reifung sehr langsam stattfindet und das Protein tetramerisiert [8].

Kapitel 3

Theoretische Grundlagen

3.1 Konfokale Fluoreszenzanregung und -detektion

Die gemeinsame Grundlage der in dieser Arbeit kombinierten Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und konfokalen Laserscanningmikroskopie (CLSM) ist die Anregung fluoreszenzmarkierter Teilchen mit Laserlicht und die konfokale Detektion der emittierten Fluoreszenz.

Liegen die optischen Elemente oder Strahlengänge der Beleuchtung und der Detektion so zueinander, dass die Brennpunkte zusammenfallen, heißt diese Anordnung konfokal. Ihr Vorteil ist die Kontrastverbesserung durch Streulichtunterdrückung: Fluoreszenz wird auch außerhalb des Beleuchtungsfokus z. B. durch gestreutes Anregungslicht erzeugt. Ein konfokaler Detektionsstrahlengang kann den Streuuntergrund zwar nicht vollständig unterdrücken, jedoch verringern, wie Abb. 3.1 zeigt. Wenn die optischen Elemente abbildende Eigenschaften haben (z. B. lichtmikroskopische Objektive), kann durch Konfokalität eine gute laterale Ortsauflösung und Tiefendiskriminierung erreicht werden.

Die Anwendung des konfokalen Prinzips in der Lichtmikroskopie wurde bereits von M. Minsky 1957 konzipiert, jedoch führte erst die (Weiter-)Entwicklung von hochempfindlichen Detektoren, mechanischen Scannern, Lasern, konventionellen Mikroskopen und Computern zu einer raschen Verbreitung seit Mitte der 1980er Jahre. Für FCS sind konfokale optische Aufbauten prinzipiell erforderlich: Nachdem in den 1970er Jahren mit Parabolspiegeln und konventionellen Linsen experimentiert wurde, sind die Entwicklungen in der konfokalen Mikroskopie inzwischen erfolgreich auf FCS übertragen worden.

Für diese Arbeit wurde ein bestehender FCS-Aufbau zu einem CLSM erweitert und für intrazelluläre Messungen verwendet. Wie in Abb. 3.1 skizziert, tritt der Laserstrahl kollimiert aus einer Faser, wird mit einer Linse fokussiert und dahinter über den Kameraausgang eines Lichtmikroskops in das Objektiv eingekoppelt. Das Fluoreszenzlicht wird über das gleiche Objektiv und den gleichen Lichtweg aus dem Mikroskop und mittels Filtern, Spiegeln und Linsen zu den Detektoren geführt. In der Zwischenbildebene des Mikroskops vor dem Kameraausgang besitzt der anregende Laser eine Strahltaile und der Detektionsstrahlengang eine Lochblende (Pinhole). Sie befinden sich an zueinander konjugierten Positionen, getrennt durch einen dichroitischen Spiegel. Dies gewährleistet die Konfokalität. Entweder wird an einer definierten Position in der Probe der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzsignals aufgenommen und analysiert – FCS – oder das Anregungslicht über die Probe mittels drehbarer Spiegel gescannt und punktweise die Fluoreszenzintensität mit der Ortsinformation verknüpft – CLSM.

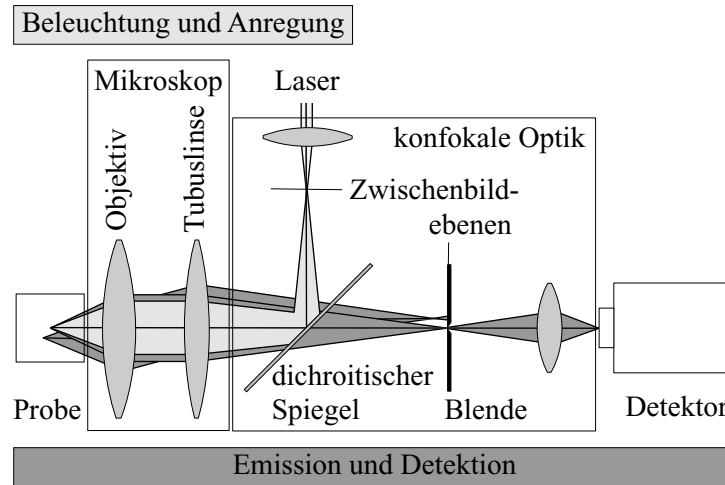


Abbildung 3.1: Das konfokale Prinzip am Beispiel der Fluoreszenzanregung und -detektion in einem Mikroskop: Fluoreszenzlicht, das nicht aus dem gemeinsamen Fokus emittiert wird, wird durch die Detektionsblende abgeschirmt.

3.1.1 Beleuchtung – Fluoreszenz – Detektion

Das am Detektor nachgewiesene Signal entsteht durch eine Kette von Prozessen: Der Anregung des Fluorophors durch den Laser folgt die Umwandlung in Fluoreszenzphotonen, die im Detektor elektrische Impulse erzeugen werden. Alle Schritte können entweder durch geräte- und probenspezifische Parameter und Funktionen oder durch spektrale und geometrische Abhängigkeiten beschrieben werden [152].

Beleuchtung: Das Prinzip der Mehrfarben-FCS und -CLSM sieht vor, dass fluoreszenzmarkierte Teilchen durch Laser unterschiedlicher Wellenlängen $\lambda_{\text{ill},i}$ angeregt werden, die auf ein möglichst kleines gemeinsames Volumen fokussiert sind. Die räumlichen Intensitätsverteilungen ergeben sich aus der jeweiligen Laserleistung P_i und einer gerätespezifischen Funktion $\Omega_i(\mathbf{r})$, die das Strahlprofil des Lasers und die Abbildungseigenschaften des Objektivs berücksichtigt:

$$I_{\text{ill},i}(\mathbf{r}) = P_i \Omega_i(\mathbf{r}). \quad (3.1)$$

Vor allem Beugungseffekte und chromatische Fehler der Optik bewirken die spektrale Abhängigkeit, die aber mit einem Index i erfasst werden kann, da mit diskreten Laserlinien gearbeitet wird.

Fluoreszenz: Für biologische Fragestellungen werden häufig Makromoleküle wie DNA oder Proteine verwendet, an die Fluorophore gebunden sind. Die spektralen Eigenschaften werden durch den Typ, die Anzahl und die Bindung der Fluorophore bestimmt. Der Absorptionsprozess überführt mit einer wellenlängenabhängigen Wahrscheinlichkeit $\epsilon(\lambda)$, dem Absorptionsspektrum, den Fluorophor in einen angeregten Zustand. Anschließend kommt es mit der Wahrscheinlichkeit $q(\lambda)$, dem Emissionsspektrum, zum strahlenden Übergang in den Grundzustand.

Detektion: Fluoreszenzphotonen werden isotrop abgestrahlt. Die Wahrscheinlichkeit, dass sie vom Objektiv aufgefangen werden und auf den Detektor j treffen, wird von der Position \mathbf{r} des Teilchens in der Probe bestimmt und als geometrische Transferfunktion $\text{GTF}_j(\mathbf{r})$ bezeichnet. Die spektrale Transferfunktion $\text{STF}_j(\lambda_{\text{det}})$ hingegen berücksichtigt die Eigenschaften der Emissionsfilter und die spektrale Nachweiseffizienz der Detektoren. Verwendet man zur Detektion Photomultiplier (PMTs) oder Avalanche-Photodioden (APDs), so zeigt sich die Quantennatur des Umwandlungsprozesses von Licht in elektrische Signale in einer zusätzlichen Poisson-Verbreiterung der Anzahl der nachgewiesenen Photonen, dem sogenannten Shot Noise [120].

Zusammen ergeben die eingeführten Größen und Funktionen den am Detektor j nachgewiesenen Photonenfluss eines Fluorophors, der sich am Ort \mathbf{r} in der Probe befindet und mit der Laserlinie i angeregt wird:

$$f_j(\mathbf{r}) = \underbrace{P_i \Omega_i(\mathbf{r}) \epsilon(\lambda_{\text{ill},i})}_{\text{Beleuchtung, Anregung}} \underbrace{\text{GTF}_j(\mathbf{r}) \int d\lambda_{\text{det}} q(\lambda_{\text{det}}) \text{STF}_j(\lambda_{\text{det}})}_{\text{Emission, Detektion}}. \quad (3.2)$$

Sie lassen sich zusammenfassen zu einer durch die anregende Wellenlänge i und den Detektionskanal j bestimmten Konstanten σ_{ij} , dem Farbmatrixelement [152], und einer räumlichen Detektionswahrscheinlichkeit $\Psi_{ij}(\mathbf{r})$, der molecular detection efficiency MDE [6], so dass mit

$$\sigma_{ij} = \epsilon(\lambda_{\text{ill},i}) \int d\lambda_{\text{det}} q(\lambda_{\text{det}}) \text{STF}_j(\lambda_{\text{det}}) \quad \text{und} \quad (3.3)$$

$$\Psi_{ij}(\mathbf{r}) = \Omega_i(\mathbf{r}) \text{GTF}_j(\mathbf{r}) \quad (3.4)$$

bei Verwendung mehrerer Anregungslinien am Detektor folgendes Signal nachgewiesen wird:

$$f_j(\mathbf{r}) = \sum_i P_i \sigma_{ij} \Psi_{ij}(\mathbf{r}). \quad (3.5)$$

Die Farbmatrix wird durch die Eigenschaften der Fluorophore und der optischen Elemente des Systems (wie Laserlinien und Emissionsfilter) definiert. Unter idealen Bedingungen verschwinden in Mehrfarbenexperimenten die Nichtdiagonalelemente der Farbmatrix, d.h. es kommt nicht zu sogenanntem Übersprechen oder Crosstalk. Dieser Effekt wird in Abschnitt 3.2.6 diskutiert, ansonsten werden eben diese idealen Voraussetzungen angenommen. Je eine Laserlinie und ein Detektionskanal werden zusammengefasst und im Folgenden mit $k, l \in \{1, 2\}$ indiziert.

3.1.2 Verschiedene Strahlgeometrien

Sowohl für FCS als auch für CLSM ist ein möglichst kleiner Fokus wünschenswert. Die kleinste denkbare Lichtquelle zur Anregung ist ein Leuchtpunkt in der Zwischenbildebene des Mikroskops, der aber in Folge von Beugung nicht als Punkt in die Objektebene abgebildet wird, sondern als verschmierte Intensitätsverteilung, die Point Spread Function der Beleuchtung $\text{PSF}_{\text{ill}}(\mathbf{r})$ [52, 106]. Von allen Punkten innerhalb dieser PSF kann Fluoreszenz emittiert werden, deren Emissionsprofil wiederum durch die Detektions-PSF $\text{PSF}_{\text{det}}(\mathbf{r})$ in der Zwischenbildebene aufgeweitet wird.

Man verwendet daher in der Zwischenbildebene zur Anregung eine Strahltaile, deren Radius, bei dem die Intensität auf $1/e^2$ abgefallen ist, gleich dem oder kleiner als der $1/e^2$ -Radius der $\text{PSF}_{\text{ill}}(\mathbf{r})$ multipliziert mit dem Abbildungsmaßstab β des Objektivs ist. Dies beeinflusst das Beleuchtungsprofil an der Eingangsapertur des Objektivs und damit das Profil der $\text{PSF}_{\text{ill}}(\mathbf{r})$, wie Abb. 3.2 g zeigt: Je kleiner die Strahltaile gewählt ist, umso breiter ist das Beleuchtungsprofil und umgekehrt.

Der Radius der Detektionsblende sollte etwa gleich dem $1/e^2$ -Radius der $\text{PSF}_{\text{det}}(\mathbf{r})$ multipliziert mit β gewählt werden. Dann ist gewährleistet, dass einerseits nur Fluoreszenz aus dem Beleuchtungsfokus durch die Lochblende tritt und andererseits möglichst wenig Signal aus dem Fokus abgeschnitten wird.

Unter diesen Voraussetzungen entsprechen die räumlichen Funktionen $\Omega_i(\mathbf{r})$ – Gl. (3.1) – und $\text{GTF}_j(\mathbf{r})$ der Beleuchtungs- und der Detektions-PSF, und die Detektionswahrscheinlichkeit ist [145]

$$\Psi_k(\mathbf{r}) = \text{PSF}_{\text{ill},k}(\mathbf{r})\text{PSF}_{\text{det},k}(\mathbf{r}), \quad (3.6)$$

Man spricht von wellenoptischer Konfokalität [169]. Insbesondere für größere Blendendurchmesser ist eine zusätzliche Faltung der Detektions-PSF mit dem Transmissionsprofil in der Zwischenbildebene vorzunehmen [103, 125, 127].

Gauß'sches Strahlprofil: Beleuchtet man die Eingangsapertur des Objektivs mit Laserlicht in TEM_{00} -Mode, dessen $1/e^2$ -Radius gleich dem Aperturradius ist, ist die Intensitätsverteilung in der Probe näherungsweise ein Gauß'sches Strahlprofil

$$\text{PSF}_{\text{ill},k}(\mathbf{r}) = \left(\frac{w_0}{w(z)} \right)^2 \exp \left(-2 \frac{x^2 + y^2}{w^2(z)} \right) \quad \text{mit} \quad (3.7)$$

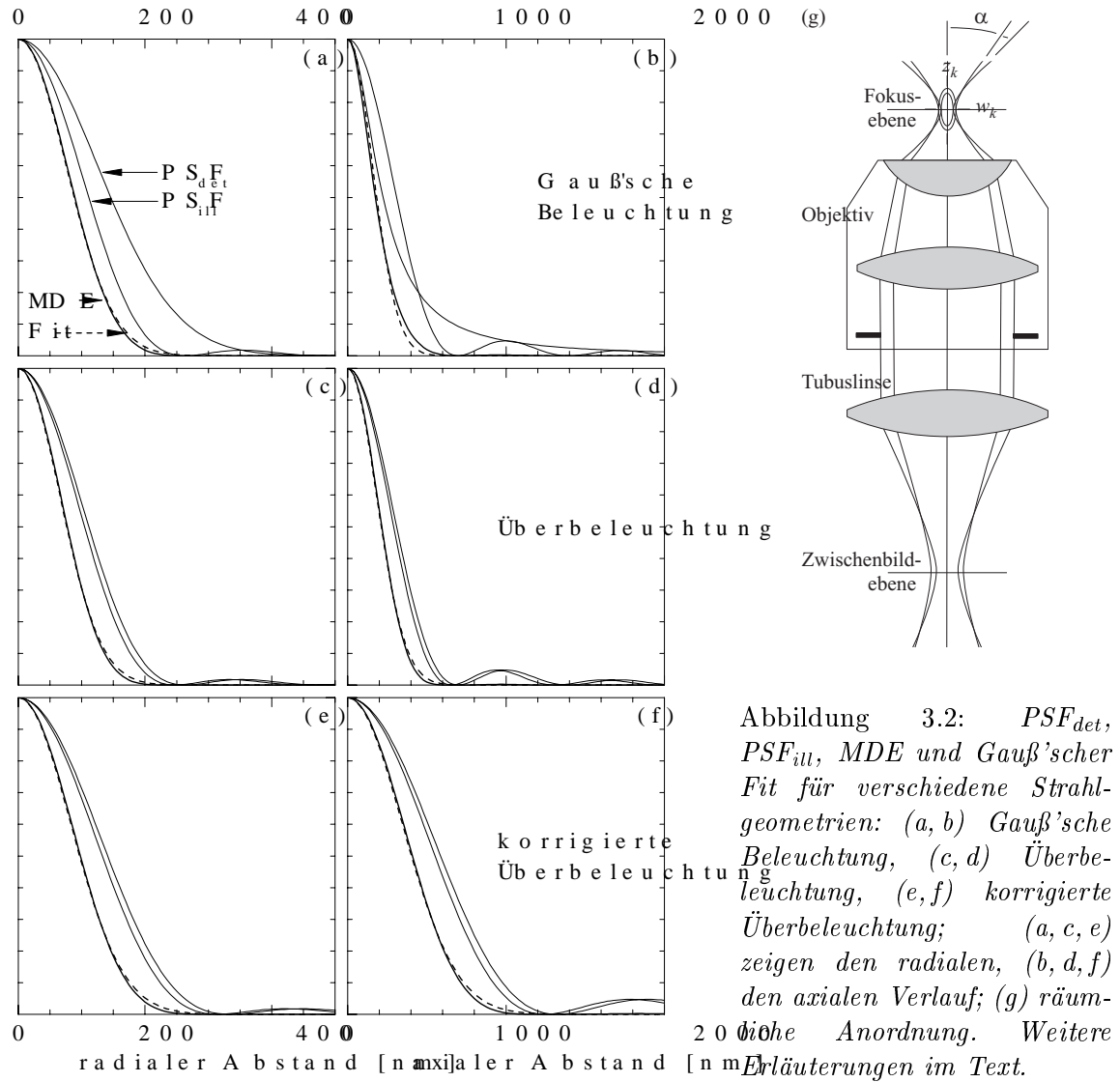
$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \frac{z^2 \alpha^2}{w_0^2}}, \quad w_0 = \frac{\lambda_{\text{ill},k}}{n\pi\alpha}, \quad \text{NA} = n \sin \alpha, \quad (3.8)$$

dabei ist w_0 die laterale Strahltaile, NA die numerische Apertur, α der maximale Winkel des konvergenten Lichts zur optischen Achse und n der Brechungsindex. Die optische Achse entspricht der z -Achse. Gl. (3.7) und (3.8) gelten nur in paraxialer Näherung ($\text{NA} < 0,7$), für große NA kann die Strahltaile unter das Abbé'sche Beugungslimit $w_0 = 0,61\lambda/\text{NA}$ sinken. Dann ist w_0 durch $0,61\lambda/\text{NA}$ zu ersetzen. Die reine Detektion wird beschrieben durch die PSF bei gleichförmig beleuchteter Apertur:

$$\text{PSF}_{\text{det},k}(\mathbf{r}) = \left(\frac{\sin u}{u} \right)^2 \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^2 \quad \text{mit} \quad (3.9)$$

$$u = n \frac{2\pi}{\lambda_{\text{det},k}} z \sin^2(\alpha/2), \quad v = n \frac{2\pi}{\lambda_{\text{det},k}} \sqrt{x^2 + y^2} \sin \alpha. \quad (3.10)$$

Anschaulich ist dies lateral das Beugungsbild einer Kreisblende – daher die Besselfunktion J_1 – und axial das eines Spaltes – daher die Sinusfunktion [142, 52]. Das laterale Hauptmaximum wird als Airy disk mit dem Radius $0,61\lambda/\text{NA}$ bezeichnet. Gl. (3.9) und (3.10) sind für größere NA nur approximiert gültig.



Überbeleuchtete Eingangsapertur: In diesem Fall ist die Beleuchtungsstrahltaile kleiner als der $1/e^2$ -Radius der PSF in der Zwischenbildebene und die Intensität an der Eingangsapertur näherungsweise konstant. Dann sind Beleuchtungs- und Detektions-PSF nach Gl. (3.9) mit zugehörigen Wellenlängen zu beschreiben.

Die Detektionswahrscheinlichkeiten für typische experimentelle Parameter sind in Abb. 3.2 dargestellt: Die Anpassung einer dreidimensionalen Gaußfunktion Gl. (3.27), die für die Berechnung analytischer Korrelationsfunktionen notwendig ist, zeigt eine gute Übereinstimmung mit den MDE $\Psi_k(\mathbf{r})$. Gewählt werden $\lambda_{ill,k} = 488 \text{ nm}$ (die im Rahmen dieser Arbeit überwiegend verwendete Laserlinie), $\lambda_{det,k} = 519 \text{ nm}$, $NA = 1,2$ und $n = 1,34$ (für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Wasserimmersionsobjektiv) entsprechend einem halben Aperturwinkel von $63,6^\circ$. Damit ergeben sich der radiale und der axiale $1/e^2$ -Radius zu

$$\begin{aligned} w_k &= 150 \text{ nm}, & z_k &= 312 \text{ nm} && \text{für Gauß'sche Beleuchtung, Abb. 3.2 a, b,} \\ w_k &= 130 \text{ nm}, & z_k &= 361 \text{ nm} && \text{für Überbeleuchtung, Abb. 3.2 c, d.} \end{aligned} \quad (3.11)$$

Da einerseits die Beschreibung als Gauß'scher Strahl bei großer NA am wenigsten geeignet, andererseits die Ausleuchtung der Objektiv-Eingangsapertur im hier verwendeten experimentellen Aufbau jedoch gaußförmig ist, ergibt sich als weiterer Ansatz die Berechnung der PSF nach Gl. (3.9) mit reduzierter NA: Für α wird der zum Intensitätsabfall auf $1/e$ (nicht $1/e^2$) gehörende Winkel $\alpha = 63,6^\circ/\sqrt{2} = 45,0^\circ$ (NA= 0,95) gewählt:

$$w_k = 164 \text{ nm}, \quad z_k = 685 \text{ nm} \quad \text{für korrigierte Überbeleuchtung, Abb. 3.2 e, f.} \quad (3.12)$$

3.1.3 Fokusgröße und räumliche Auflösung

Die Größe des Fokus bestimmt die räumliche Auflösung eines Mikroskops, die als der minimale Abstand definiert ist, den zwei gleichhelle Lichtpunkte in der Objektebene haben dürfen, um noch als getrennte Punkte aufgelöst zu werden. Dies entspricht den Halbwertsbreiten der Detektionsfunktion $\Psi_k(\mathbf{r})$:

$$\Delta w_{\text{FWHM}} = w_k \sqrt{2 \ln 2} \quad \text{lateral und} \quad \Delta z_{\text{FWHM}} = z_k \sqrt{2 \ln 2} \quad \text{axial.} \quad (3.13)$$

Beispielsweise erfordern Dekonvolutionsverfahren für mikroskopische Bilder eine möglichst genaue Kenntnis von $\Psi_k(\mathbf{r})$. Die Fokusgröße bestimmt auch die mittlere Aufenthaltsdauer diffundierender Moleküle im Fokus, so dass bei genauer Kenntnis von $\Psi_k(\mathbf{r})$ mit FCS-Experimenten Diffusionskoeffizienten bestimmt werden können und umgekehrt mit der Diffusion von Molekülen mit bekanntem Diffusionskoeffizienten der Fokus „vermessen“ werden kann [143, 58]. Nimmt man w_k, z_k nach Gl. (3.12) als Radien eines Rotationsellipsoids, so hat der Fokus ein Volumen von

$$V_{\text{focus}} = \frac{4}{3} \pi w_k^2 z_k = 77 \text{ al.} \quad (3.14)$$

3.2 Grundlagen der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Eine FCS-Messung ergibt die Korrelationsfunktion der Fluktuationen von Fluoreszenzsignalen, die Moleküle in einem mikroskopischen Fokusvolumen emittieren, wenn sie mit kontinuierlichem Laserlicht beleuchtet werden. Diese Signalfuktuationen können verschiedene Ursachen haben, die entweder Diffusionsprozessen oder Übergängen zwischen elektronischen sowie Konformationszuständen zugeordnet werden können. Um diese Vorgänge zu charakterisieren, muss jeweils eine geeignete theoretische Korrelationsfunktion an die gemessene angepasst werden.

In den grundlegenden Arbeiten zur FCS aus den 1970er Jahren [81, 39, 82] wurden statistische Teilchenzahlschwankungen im Fokusvolumen durch Diffusion als Ursache der Fluktuationen angenommen. Theoretisch und experimentell wurde gezeigt, dass sich Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten chemisch wechselwirkender Komponenten sowie die Geschwindigkeitskonstanten ihrer Reaktion bestimmen lassen. Erste Anwendungen untersuchten außerdem zweidimensionale Diffusion in Membranen [40, 41].

Später wurden andere Prozesse wie die Rotationsdiffusion [37, 6], die Besetzung von Triplett- und anderen nichtstrahlenden Zuständen [165, 54] und Konformationsfluktuationen einzelner Moleküle [15] als Ursache von Fluoreszenzfluktuationen berücksichtigt.

Auch der Einfluss der Strahlgeometrien auf die Korrelationsfunktionen ist für verschiedene experimentelle Aufbauten behandelt worden [39, 6, 125, 127, 58], insbesondere in Folge der Weiterentwicklung hochauflösender konfokaler Mikroskopie. FCS ist auch zur Bestimmung der Größe des Fokus verwendet worden [143, 58].

Die Zweifarben-FCS mit der Kreuzkorrelation spektral unterschiedlicher Fluoreszenzen (FCCS) [129, 137, 152, 72] ist besonders zur Untersuchung biochemischer Interaktionen geeignet. Die Entwicklung ultrakurz gepulster Laser im nahen Infrarotbereich erlaubt Multiphotonenanregung für FC(C)S ebenso wie in der konfokalen Mikroskopie [11, 139].

Neben der FCS sind weitere Methoden der Fluoreszenzfluktuationsspektroskopie entwickelt worden: Durch die Kinetik von Photobleaching kann Diffusion untersucht werden [7, 111]. Die Identifizierung spektraler Spezies und die Charakterisierung von Aggregation geschieht durch die Analyse der Photonverteilungen [123, 27, 63] oder durch Korrelationsfunktionen höherer Ordnung [100, 102, 101]. Und auch räumliche Korrelationen fluoreszierender Moleküle können studiert werden [112, 114, 10, 167].

Die Charakterisierung von Diffusions- und Transportprozessen in lebenden Zellen mit FCS gewinnt zunehmend an Bedeutung, da diese Methode nichtinvasiv, mit beugungsbegrenzter Ortsauflösung und ohne wesentliche Störungen lokaler Gleichgewichte arbeitet. Dabei geht die theoretische Berücksichtigung insbesondere des Einflusses zellulärer Strukturen auf die Beweglichkeit einzelner Moleküle [138, 158, 46] einher mit experimentellen Weiterentwicklungen, die FCS mit Fluoreszenzmikroskopie verknüpft [17].

Die theoretischen Grundlagen der FCS in diesem Abschnitt werden angelehnt an [153, 152] dargestellt und gegebenenfalls erweitert. Die folgenden Abschnitte beleuchten Aspekte, die bei komplexeren biologischen Systemen wie Makromolekülen und Zellen besonders zu berücksichtigen sind.

3.2.1 Die Korrelationsfunktion einer Spezies

Betrachtet wird zunächst ein System aus N nicht wechselwirkenden Teilchen in einem Probenvolumen V , die entweder einfarbig fluoreszenzmarkiert sind mit Farbstoffen der Sorte $k \in \{1, 2\}$ oder zweifarbig mit je einem Fluorophor jeder Sorte. Die Fluorophore können zwei Detektionskanälen $k \in \{1, 2\}$ zugeordnet werden. Es sei $\Psi_k(\mathbf{r})$ die Detektionswahrscheinlichkeit eines am Ort \mathbf{r} lokalisierten Fluorophors im Kanal k und $f_{k,n}(t)$ das nachgewiesene Signal des Teilchens n am Ort $\mathbf{r}(t)$ (Gl. (3.4) und (3.5)). Das Gesamtsignal in einem Detektor entsteht aus der Summe der Beiträge der einzelnen Teilchen

$$F_k(t) = \sum_{n=1}^N f_{k,n}(t). \quad (3.15)$$

Beindet sich das Teilchen zur Zeit t am Ort \mathbf{r}_1 und zur Zeit $t + \tau$ am Ort \mathbf{r}_2 , so gilt mit $k, l \in \{1, 2\}$

$$f_{k,n}(t)f_{l,n}(t + \tau) \propto \Psi_k(\mathbf{r}_1)\Psi_l(\mathbf{r}_2). \quad (3.16)$$

Wenn die Teilchenbewegung ein Markow'scher Prozess ist, ergibt sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich das Teilchen zur Zeit $t + \tau$ am Ort \mathbf{r}_2 befindet unter der Voraussetzung, dass es sich zur Zeit t bei \mathbf{r}_1 befand, zu [59]

$$P_D(\mathbf{r}_2, t + \tau | \mathbf{r}_1, t) d^3r_2 = P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) d^3r_2, \quad (3.17)$$

ist also unabhängig von allen Positionen zu Zeiten kleiner t , vom Pfad $\mathbf{r}_1 \rightarrow \mathbf{r}_2$ und von zeitlichen Verschiebungen. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Teilchens an einer Position \mathbf{r}_1 beträgt

$$W_D(\mathbf{r}_1) d^3r_1. \quad (3.18)$$

Die zeitlich gemittelte Fluoreszenzintensität ergibt sich aus dem Ensemblemittelwert, dem Produkt von Detektions- und Aufenthaltswahrscheinlichkeit, integriert über das gesamte Volumen:

$$\langle f_{k,n}(t) \rangle \propto \int_V d^3 r_1 W_D(\mathbf{r}_1) \Psi_k(\mathbf{r}_1), \quad (3.19)$$

und damit:

$$\langle f_{k,n}(t) f_{l,n}(t + \tau) \rangle \propto \int_V d^3 r_1 \int_V d^3 r_2 W_D(\mathbf{r}_1) \Psi_k(\mathbf{r}_1) P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) \Psi_l(\mathbf{r}_2) \quad (3.20)$$

In einem FCS-Experiment wird die normierte Korrelationsfunktion (CF) $G_{kl}(\tau)$ der Fluktuationen der gemessenen Detektorsignale $\delta F_k(t) = F_k(t) - \langle F_k(t) \rangle$ aufgenommen, $k, l \in \{1, 2\}$ indizieren dabei die Kanäle. Wenn $k = l$ ist, handelt es sich um die Auto-, sonst um die Kreuzkorrelationsfunktion (ACF bzw. CCF):

$$\begin{aligned} G_{kl}(\tau) &= \frac{\langle \delta F_k(t) \delta F_l(t + \tau) \rangle}{\langle F_k(t) \rangle \langle F_l(t) \rangle} \\ &= \frac{\langle F_k(t) F_l(t + \tau) \rangle}{\langle F_k(t) \rangle \langle F_l(t) \rangle} - 1 \\ &= \frac{\langle \sum_{n,m=1}^N f_{k,n}(t) f_{l,m}(t + \tau) \rangle}{\langle \sum_{n=1}^N f_{k,n}(t) \rangle \langle \sum_{n=1}^N f_{l,n}(t) \rangle} - 1 \end{aligned} \quad (3.21)$$

Im Falle nicht wechselwirkender Teilchen sind die Größen $f_{k,n}(t)$ und $f_{l,m}(t + \tau)$ für alle $n \neq m$ unabhängig, damit wird der Erwartungswert ihres Produktes gleich dem Produkt ihrer Erwartungswerte. Außerdem genügt es, das Signal eines repräsentativen Teilchens n zu betrachten. Damit ergibt sich

$$\begin{aligned} G_{kl}(\tau) &= \frac{N \langle f_{k,n}(t) f_{l,n}(t + \tau) \rangle + N(N - 1) \langle f_{k,n}(t) \rangle \langle f_{l,n}(t) \rangle}{N^2 \langle f_{k,n}(t) \rangle \langle f_{l,n}(t) \rangle} - 1 \\ &= \frac{1}{N} \frac{\langle f_{k,n}(t) f_{l,n}(t + \tau) \rangle}{\langle f_{k,n}(t) \rangle \langle f_{l,n}(t) \rangle} - \frac{1}{N} \\ &= \frac{1}{N} \frac{\int_V d^3 r_1 \int_V d^3 r_2 W_D(\mathbf{r}_1) \Psi_k(\mathbf{r}_1) P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) \Psi_l(\mathbf{r}_2)}{\int_V d^3 r_1 W_D(\mathbf{r}_1) \Psi_k(\mathbf{r}_1) \int_V d^3 r_1 W_D(\mathbf{r}_1) \Psi_l(\mathbf{r}_1)} - \frac{1}{N}. \end{aligned} \quad (3.22)$$

Geometrische und spektrale Eigenschaften des optischen Systems bestimmen den Verlauf der Detektionswahrscheinlichkeiten, während die Eigenschaften der Probe bezüglich Diffusionsverhalten, intramolekularer Fluktuationen und Photobleaching eine geeignete Wahl der Übergangswahrscheinlichkeiten erfordern.

3.2.2 Freie Diffusion

Im Falle freier Diffusion ohne zusätzlichen Fluss oder äußere Kräfte verknüpfen das erste Fick'sche Gesetz und die Kontinuitätsgleichung den Teilchenfluss mit der Konzentration:

$$\mathbf{j}(\mathbf{r}, t) = -\hat{D}(\mathbf{r}, t) \nabla c(\mathbf{r}, t) \quad \text{und} \quad \frac{\partial c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = -\nabla \mathbf{j}(\mathbf{r}, t), \quad (3.23)$$

$\hat{D}(\mathbf{r}, t)$ ist im allgemeinsten Fall ein 3×3 -Tensor, in einer isotropen Lösung jedoch eine Konstante D_0 , der Diffusionskoeffizient. Dieser ist umgekehrt proportional zum Reibungskoeffizienten f bzw. zur Viskosität η und zum Stoke'schen oder hydrodynamischen Radius

R_h : $D_0 = kT/f = kT/6\pi\eta R_h$ [22]. Zusammen ergeben sie das zweite Fick'sche Gesetz für die Diffusion [12, 59]

$$\frac{\partial c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D_0 \nabla^2 c(\mathbf{r}, t). \quad (3.24)$$

In einem endlichen Probenvolumen stellt sich eine konstante Konzentration ein. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Moleküls ist also $W_D(\mathbf{r}, t) = 1/V$. Die Übergangswahrscheinlichkeit – Gl. (3.17) – stellt dann die Lösung der Fick'schen Diffusionsgleichung mit der Randbedingung $c(\mathbf{r}, 0) = \delta(\mathbf{r})$ dar:

$$P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) = c(\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1, \tau) = \frac{1}{(4\pi D_0 \tau)^{d/2}} \exp \left[-\frac{|\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|^2}{4D_0 \tau} \right]. \quad (3.25)$$

Mit der Zahl der Translationsfreiheitsgrade d ergibt sich daraus die mittlere quadratische Verschiebung der Brown'schen Bewegung eines Teilchens zur Einstein-Beziehung

$$\langle |\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|^2 \rangle = 2dD_0 \tau. \quad (3.26)$$

Wenn ein konfokaler Aufbau mit hoher numerischer Apertur (NA) verwendet wird, kann die Detektionswahrscheinlichkeit als rotationssymmetrische dreidimensionale Gaußfunktion um den Mittelpunkt \mathbf{p}_k mit einem $1/e^2$ -Radius von w_k senkrecht und z_k parallel zur optischen Achse approximiert werden (Abschnitt 3.1.2) [6, 103, 125, 127]:

$$\Psi_k(\mathbf{r}) = \exp \left(-2 \frac{(x - p_{k,x})^2 + (y - p_{k,y})^2}{w_k^2} - 2 \frac{(z - p_{k,z})^2}{z_k^2} \right). \quad (3.27)$$

Gl. (3.25) und (3.27) eingesetzt in Gl. (3.22) erlauben im Falle dreidimensionaler Diffusion eine Faktorisierung der CF

$$G_{kl}(\tau) = \frac{V}{N} g_x(\tau) g_y(\tau) g_z(\tau) - \frac{1}{N} \quad \text{mit} \quad (3.28)$$

$$g_x(\tau) = \frac{2}{\pi w_k w_l} \frac{1}{\sqrt{4\pi D_0 \tau}} \int_{-\infty}^{\infty} dx_1 \int_{-\infty}^{\infty} dx_2 e^{-2 \frac{(x_1 - p_{k,x})^2}{w_k^2} - 2 \frac{(x_2 - p_{l,x})^2}{w_l^2} - \frac{(x_1 - x_2)^2}{4D_0 \tau}} \quad (3.29)$$

sowie $g_y(\tau)$ und $g_z(\tau)$ entsprechend. Es wird ausgenutzt, dass das Probenvolumen wesentlich größer als das Fokusvolumen ist, deshalb können die Integrationsgrenzen ins Unendliche erweitert werden. Die Substitutionen $\mathbf{u} = \mathbf{r}_1 - \mathbf{p}_k$, $\mathbf{v} = \mathbf{r}_2 - \mathbf{p}_l$ und $\mathbf{d} = \mathbf{p}_k - \mathbf{p}_l$ führen zu

$$g_x(\tau) = \frac{2}{\pi w_k w_l} \frac{1}{\sqrt{4\pi D_0 \tau}} \int_{-\infty}^{\infty} du_x \int_{-\infty}^{\infty} dv_x e^{-2 \frac{u_x^2}{w_k^2} - 2 \frac{v_x^2}{w_l^2} - \frac{(u_x - v_x + d_x)^2}{4D_0 \tau}}, \quad (3.30)$$

dies kann als Integral einer Funktion der dimensionslosen Größen u_x/w_k , v_x/w_l über den gesamten \mathbb{R}^2 betrachtet werden. Eine geeignete Drehung des Koordinatensystems ist also erlaubt, gewählt wird mit $w_0^2 = (w_k^2 + w_l^2)/2$

$$\sqrt{2} \alpha = \frac{u_x}{w_0} \frac{w_l}{w_k} + \frac{v_x}{w_0} \frac{w_k}{w_l}, \quad \sqrt{2} \beta = \frac{u_x}{w_0} - \frac{v_x}{w_0} \quad \text{mit} \quad \alpha^2 + \beta^2 = \frac{u_x^2}{w_k^2} + \frac{v_x^2}{w_l^2}. \quad (3.31)$$

Damit folgt aus Gl. (3.30)

$$\begin{aligned} g_x(\tau) &= \frac{2}{\pi} \frac{1}{\sqrt{4\pi D_0 \tau}} \int_{-\infty}^{\infty} d\alpha e^{-2\alpha^2} \int_{-\infty}^{\infty} d\beta e^{-2\beta^2 - \frac{(\sqrt{2}w_0\beta + d_x)^2}{4D_0 \tau}} \\ &= \frac{1}{\sqrt{\pi} w_0} \left(1 + \frac{4D_0 \tau}{w_0^2} \right)^{-1/2} \exp \left(-\frac{d_x^2}{4D_0 \tau + w_0^2} \right). \end{aligned} \quad (3.32)$$

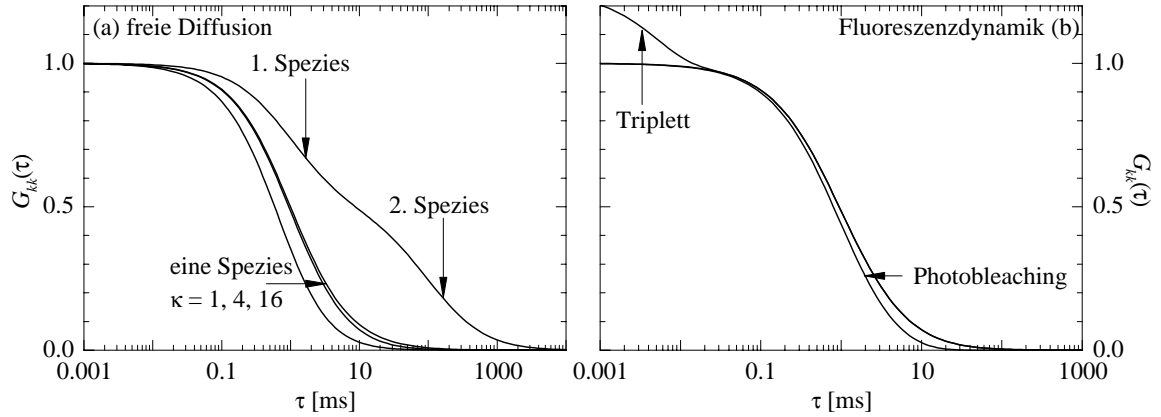


Abbildung 3.3: (a) Autokorrelationsfunktionen für eine Spezies mit $D_0 = 4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, $w_k = 0,2 \text{ } \mu\text{m}$, $\tau_{\text{diff}} = 1 \text{ ms}$ und verschiedenen Strukturparametern sowie für eine zusätzliche Spezies (Anteil 50 %) mit der hundertfachen Diffusionszeit bei $\kappa = 4$. (b) Einfluss von Tripletbesetzung ($\Theta_I = 0,2$ und $\tau_{\text{trip}} = 5 \text{ } \mu\text{s}$) und Photobleaching ($\alpha_I = 37,3 \text{ s}^{-1}$) auf die Autokorrelationsfunktion einer Spezies (Weitere Parameter siehe a).

Im vorletzten Schritt wurde berücksichtigt, dass sich auch der zweite Integrand durch quadratische Ergänzung als einfache Gaußfunktion darstellen lässt. Gl. (3.28) wird zu

$$G_{kl}(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}}\right)^{-1/2} \exp\left(-\frac{d_x^2 + d_y^2}{4D_0\tau + w_0^2} - \frac{d_z^2}{4D_0\tau + \kappa^2 w_0^2}\right) \quad (3.33)$$

mit der charakteristischen Diffusionszeit bzw. mittleren Aufenthaltsdauer im Fokus $\tau_{\text{diff}} = w_0^2/4D_0$ und der Konzentration $c = N/V$ sowie dem effektiven Fokusvolumen $V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} \kappa w_0^3 \ll V$, dem Versatz \mathbf{d} der beiden Anregungs-/Detektionsvolumina und dem Strukturfaktor $\kappa = z_0/w_0$, der die Geometrie des Fokusvolumens charakterisiert. $cV_{\text{eff}} \ll N = cV$ ist also die mittlere Zahl der Teilchen im Fokusvolumen, deshalb kann der Term $1/N$ in Gl. (3.28) vernachlässigt werden. Das effektive Fokusvolumen ist bis auf einen Faktor $\sim 1,33$ gleich dem Volumen eines Rotationsellipsoids mit dem lateralen Radius w_0 und dem axialen Radius z_0 ¹. Abb. 3.3 a zeigt den typischen Verlauf einer Autokorrelationsfunktionen für unterschiedliche Strukturparameter.

Diese Rechnungen besitzen immer dann Gültigkeit, wenn die Detektionswahrscheinlichkeit $\Psi_k(\mathbf{r})$ als Produkt dreier unabhängiger Gaußfunktionen beschrieben oder approximiert werden kann. Gegebenenfalls muss ein weiterer Strukturfaktor eingeführt werden. Möchte man die exakte Darstellung verwenden, so lässt sich die Korrelationsfunktion i. a. nicht analytisch berechnen, sondern ist numerisch zu bestimmen.

3.2.3 Vergleich von Auto- und Kreuzkorrelation

Im Falle der Autokorrelationsfunktion sind die Detektionswahrscheinlichkeiten $\Psi_k(\mathbf{r})$ und $\Psi_l(\mathbf{r})$ identisch, daher verschwindet auch ihr Versatz \mathbf{d} . Gl. (3.33) vereinfacht sich mit

¹der Faktor $3\sqrt{\pi}/4 \simeq 1,33$ ergibt sich aus dem Vergleich mit Gl. (3.14)

$w_0^2 = w_k^2$ und $z_0^2 = z_k^2$ zu

$$G_{kk}(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}}\right)^{-1/2}. \quad (3.34)$$

Bei Kreuzkorrelationsexperimenten hingegen interessiert vor allem das Verhältnis von Kreuz- zu Autokorrelationsamplitude

$$\frac{G_{kl}(0)}{G_{kk}(0)} = \frac{V_{\text{eff},kk}}{V_{\text{eff},kl}} \exp \left(-\frac{d_x^2 + d_y^2}{4D_0\tau + w_0^2} - \frac{d_z^2}{4D_0\tau + \kappa^2 w_0^2} \right), \quad (3.35)$$

d. h. bereits ein lateraler Versatz der Foki von $w_0/2$ z. B. aufgrund chromatischer Fehler insbesondere fern der optischen Achse führt zu einer Verringerung auf 78 %.

Da bei beugungsbegrenzter Beleuchtung *und* Detektion die Ausdehnung des Detektionsvolumens in lateraler wie axialer Richtung näherungsweise proportional zum Mittel aus Anregungswellenlänge und Emissionsmaximum $\sqrt{\lambda_{\text{ill}}\lambda_{\text{det}}}$ ist (siehe Abschnitt 3.1.2), führt die nicht vollständige Überdeckung der Foki zu einer weiteren Verringerung gemäß

$$\frac{G_{kl}(0)}{G_{kk}(0)} = \left(\frac{2\lambda_{\text{ill},k}\lambda_{\text{det},k}}{\lambda_{\text{ill},k}\lambda_{\text{det},k} + \lambda_{\text{ill},l}\lambda_{\text{det},l}} \right)^{3/2}, \quad (3.36)$$

bei Werten von 488 nm und 519 nm für den ersten sowie 568 nm und 600 nm für den zweiten spektralen Kanal sind es 79 %. Dieses Problem kann korrigiert werden, wenn man unterschiedliche Fluorophore nicht spektral, sondern anhand ihrer Lebensdauern unterscheidet [140]: Dann sind $\lambda_{\text{ill},k} = \lambda_{\text{ill},l}$ und $\lambda_{\text{det},k} = \lambda_{\text{det},l}$. Jedoch kommt es weiterhin zu Übersprechen, das im Abschnitt 3.2.6 behandelt wird.

3.2.4 Triplettkorrektur

Der Vorgang der Anregung und Emission von Fluoreszenz ist bisher vereinfachend als kontinuierlicher Prozess betrachtet worden. Aufgrund der Quantennatur des Lichts und der elektronischen Zustände der Fluorophore (Abb. 3.4) kommt es jedoch zu sehr viel mehr Fluktuationen des am Detektor nachgewiesenen Photonenflusses. Ein Fluorophor wird durch Anregungslicht vom Grundzustand S_0 in den Singulettzustand S_1 angehoben und fällt nach der mittleren Lebensdauer von wenigen ns mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit, der Quantenausbeute, unter Emission eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand

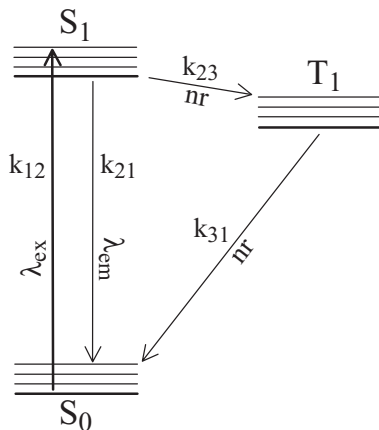


Abbildung 3.4: *Typisches Termschema eines Fluorophors mit den entsprechenden Übergangsraten: Befindet sich das Molekül im langlebigen Tripletzzustand T_1 , wird der kontinuierliche Absorptions- und Emissionszyklus zwischen den Singulettzuständen S_0 und S_1 unterbrochen.*

zurück, um wieder angeregt werden zu können. Alternativ kann es aber auch nichtstrahlend in einen metastabilen Triplettzustand T_1 übergehen (intersystem crossing [35]), der nach vergleichsweise langer Zeit ($\sim \mu\text{s}$) ebenfalls nichtstrahlend in den Grundzustand zerfällt, so dass der quasikontinuierliche Photonenfluss² für einige Zeit unterbrochen wird.

Die zeitliche Entwicklung der Besetzungswahrscheinlichkeiten für die drei Zustände beschreiben die folgenden gekoppelten Ratengleichungen [165]

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T_1(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{12} & k_{21} & k_{31} \\ k_{12} & -k_{21} - k_{23} & 0 \\ 0 & k_{23} & -k_{31} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T_1(t) \end{pmatrix}. \quad (3.37)$$

Zur Korrelationsfunktionen tragen nur Moleküle bei, die zur Zeit $t = 0$ ein Photon emittiert haben und sich in S_0 befinden:

$$\begin{pmatrix} S_0(0) \\ S_1(0) \\ T_1(0) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (3.38)$$

Es stellt sich ein Besetzungsgleichgewicht ein. Mit dieser Randbedingung und der Annahme, dass die Übergänge zwischen den Singulett-niveaus sehr viel schneller vor sich gehen als die Intersystem-Übergänge, d. h. $k_{12}, k_{21} \gg k_{23}, k_{31}$, kann der zeitliche Verlauf der Besetzung von S_1 analytisch angegeben werden:

$$S_1(t) = \Sigma_1 \left(1 - \frac{1}{1 - \Theta_1} e^{-\lambda_1 t} + \frac{\Theta_1}{1 - \Theta_1} e^{-\lambda_2 t} \right), \quad (3.39)$$

Der zeitliche Verlauf der Besetzung von S_0 und T_1 ist uninteressant, da die Emissionsrate von Fluoreszenzphotonen gleich $k_{21} S_1(t)$ ist. Die Zeitkonstanten ergeben sich zu

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= k_{12} + k_{21} & \text{und} \\ \lambda_2 &= k_{31} + k_{23} \frac{k_{12}}{k_{12} + k_{21}} \end{aligned} \quad (3.40)$$

und die Besetzungswahrscheinlichkeiten des angeregten Singuletts Σ_1 und des Triplets Θ_1 im Gleichgewicht zu

$$\begin{aligned} \Sigma_1 &= \frac{k_{12} k_{31}}{k_{12} k_{23} + k_{12} k_{31} + k_{21} k_{31}} & \text{und} \\ \Theta_1 &= \frac{k_{12} k_{23}}{k_{12} k_{23} + k_{12} k_{31} + k_{21} k_{31}}. \end{aligned} \quad (3.41)$$

Für ein immobilisiertes und kontinuierlich beleuchtetes Molekül ist die Korrelationsfunktion der Fluoreszenzfluktuationen damit direkt durch die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass zur Zeit $t = \tau$ ein Photon emittiert wird, unter der Bedingung, dass zur Zeit $t = 0$ ebenfalls eines emittiert wurde, sowie durch die mittlere Emissionsrate:

$$G_{\text{trip}}(\tau) = \frac{S_1(\tau) - \Sigma_1}{\Sigma_1} = -\frac{1}{1 - \Theta_1} e^{-\lambda_1 \tau} + \frac{\Theta_1}{1 - \Theta_1} e^{-\lambda_2 \tau} \quad (3.42)$$

Für sehr kurze Zeiten ist also $G_{\text{trip}}(\tau) = -1$, um dann auf $\Theta_1/(1 - \Theta_1)$ anzusteigen und anschließend exponentiell auf Null abzufallen. Diese Antikorrelation wird als photon antibunching bezeichnet [9] und verdeutlicht, dass ein Molekül keine zwei Photonen direkt

²Das kleinste Samplingintervall der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Datennahmekarten ist 200 ns

hintereinander emittieren kann. Der Abfall (photon bunching) zeigt, dass sich ein Gleichgewicht einstellt. Die Zeitaufösung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten experimentellen Komponenten erlaubt nur die Beobachtung des Bunching-Anteils, der $e^{-\lambda_1 \tau}$ -Term in Gl. (3.42) fällt also weg.

Es sei hier nur erwähnt, dass die Raten k_{12}, k_{21} und k_{23} , also auch die Parameter Θ_1 und λ_2 , abhängig von der Intensität der Beleuchtung und damit ortsabhängig sind. Da aber die Zeitkonstante $\tau_{\text{trip}} = 1/\lambda_2$ nur wenige μs beträgt, kann man die Beleuchtung als konstant ansehen, weil sich ein bewegliches Molekül in dieser Zeit kaum bewegt. Triplett- und diffusionsbedingte Fluktuationen sind daher unabhängig voneinander und tragen als Summanden zur gesamten Autokorrelationsfunktion bei:

$$\begin{aligned} G_{kk}(\tau) &\simeq \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}}\right)^{-1/2} + \frac{\Theta_1}{1 - \Theta_1} e^{-\tau/\tau_{\text{trip}}} \right] \\ &\simeq \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left(\frac{1 - \Theta_1 + \Theta_1 e^{-\tau/\tau_{\text{trip}}}}{1 - \Theta_1} \right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}}\right)^{-1/2} \end{aligned} \quad (3.43)$$

In guter Näherung kann dem Besetzungsgleichgewicht von Singulett- und Triplettzuständen also mit einem Vorfaktor Rechnung getragen werden (Abb. 3.3 b). Zu sehr kurzen Verzögerungszeiten steht die Amplitude der Korrelationsfunktion also für die Zahl der leuchtenden Moleküle, später ($\tau > \tau_{\text{trip}}$) für die Gesamtzahl der Moleküle. Da die Besetzungsgleichgewichte verschiedener Fluorophore unabhängig voneinander sind, ist der Tripletteffekt in Kreuzkorrelationsexperimenten nicht zu beobachten.

3.2.5 Berücksichtigung von Photobleaching

Eine weitere Ursache für Intensitätsschwankungen am Detektor ist die irreversible Umwandlung der Chromophore der Farbstoffmoleküle in einen nichtstrahlenden Zustand. Diese können nur eine mittlere maximale Anzahl von typischerweise 10^6 Fluoreszenzphotonen emittieren [88], bis es zu einer photoinduzierten Veränderung der Molekülstruktur und damit der am Fluoreszenzprozess beteiligten Übergänge kommt.

In freier Lösung kann dies oft vernachlässigt werden, wie folgende Abschätzung zeigt: Bei einem Probenvolumen von $100 \mu\text{l}$ und einem Fokusvolumen von 1 fl ist die Wahrscheinlichkeit sehr klein, dass ein fluoreszierendes Molekül während einer Messzeit von 100 s in den Fokus zurückkehrt. Bei einer Konzentration von 10 nM , einer mittleren Aufenthaltsdauer von 1 ms im Fokus und einer gemessenen Rate von 100 kHz mit 5% Gesamtausbeute emittiert jedes Molekül weniger als 1000 Photonen. In deutlich kleineren Probenvolumina – eine kugelförmige Zelle mit einem Radius von $10 \mu\text{m}$ entspricht 5 pl – ist der Bleicheffekt jedoch zu berücksichtigen, ebenso wie bei sehr langsam diffundierenden Molekülen und solchen, die zeitweise Bindungen mit immobilisierten Strukturen eingehen und deshalb sehr viel länger beleuchtet werden.

Nimmt man an, dass die Umwandlung des Fluorophors eine irreversible Reaktion erster Ordnung mit der Rate $\beta_k P_k \text{PSF}_{\text{ill},k}(\mathbf{r})$ proportional zur Beleuchtungsintensität ist [7, 111], nimmt die Konzentration ab um

$$\left[\frac{\partial c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \right]_{\text{bleach}} = -\alpha_k \text{PSF}_{\text{ill},k}(\mathbf{r}) c(\mathbf{r}, t) \quad (3.44)$$

mit $\alpha_k = \beta_k P_k$. Das normierte Beleuchtungs- und das normierte Detektionsprofil lassen sich als $\text{PSF}_{\text{ill},k}(\mathbf{r}) \simeq \text{PSF}_{\text{det},k}(\mathbf{r}) \simeq \sqrt{\Psi_k(\mathbf{r})}$ nähern.

Für frei diffundierende Moleküle ist die Diffusionsgleichung (3.24) um Gl. (3.44) zu erweitern, allerdings kann für die entstehende Differenzialgleichung keine geschlossene Lösung gefunden werden. Wenn der Anteil der pro Sekunde gebleichten Fluorophore jedoch klein bzw. $\alpha_k \tau_{\text{diff}} \ll 1$ ist, löst der Ansatz

$$\begin{aligned} P_{D,kl}(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) &= \frac{1}{(4\pi D_0 \tau)^{d/2}} \exp \left[-\frac{|\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|^2}{4D_0 \tau} \right] \exp \left(-\alpha_l [\Psi_k(\mathbf{r}_2) \Psi_l(\mathbf{r}_1)]^{1/4} \tau \right) \\ &= P_{D,\text{free}}(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) \sum_{n=0}^{\infty} \alpha_l^n [\Psi_k(\mathbf{r}_2) \Psi_l(\mathbf{r}_1)]^{n/4} \tau^n \\ &= P_{D,\text{free}}(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) P_{\alpha,kl}(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) \end{aligned} \quad (3.45)$$

die Diffusionsgleichung in geeigneter Näherung³. Auch $P_{D,kl}(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0)$ ist symmetrisch in \mathbf{r}_1 und \mathbf{r}_2 und faktorisierbar. Für endliche Probenvolumina führt das Bleichen zu einem langsamen Abfall der gesamten Anzahl an Fluorophoren (siehe Abschnitt 3.5.3 und [158]), der aber für die Dauer einer Korrelationsmessung als konstant angesehen werden kann. In Analogie zu Abschnitt 3.2.2 ergibt sich anstelle von Gl. (3.32)

$$\begin{aligned} g_x(\tau) &= \frac{1}{\sqrt{\pi} w_0} \left\{ \left(1 + \frac{4D_0 \tau}{w_0^2} \right)^{-1/2} \exp \left(-\frac{d_x^2}{4D_0 \tau + w_0^2} \right) \right. \\ &\quad \left. - 2 \frac{\alpha_l \tau}{5^{1/2}} \left(1 + \frac{5D_0 \tau}{w_0^2} \right)^{-1/2} \exp \left(-\frac{d_x^2}{5D_0 \tau + w_0^2} \right) - \dots + \dots \right\} \\ &= \frac{1}{\sqrt{\pi} w_0} \sum_{n=0}^{\infty} 2 \frac{(\alpha_l \tau)^n}{(4+n)^{1/2}} \left(1 + \frac{(4+n)D_0 \tau}{w_0^2} \right)^{-1/2} \exp \left(-\frac{d_x^2}{(4+n)D_0 \tau + w_0^2} \right). \end{aligned} \quad (3.46)$$

Da Diffusionszeiten, die sich um weniger als 20 % unterscheiden, in FCS-Experimenten nicht getrennt auflösbar sind [152] und die Annahme $\alpha_l \tau_{\text{diff}} \ll 1$ gemacht wurde, lässt sich die Näherung

$$g_x(\tau) = \frac{1}{\sqrt{\pi} w_0} \left(1 + \frac{4D_0 \tau}{w_0^2} \right)^{-1/2} \exp \left(-\frac{d_x^2}{4D_0 \tau + w_0^2} \right) \exp \left(-\frac{2}{\sqrt{5}} \alpha_l \tau \right) \quad (3.47)$$

angeben. Es wird der Bleachingeffekt in dem Kanal berücksichtigt, dessen Signal als verzögerter Beitrag in die Korrelationsfunktion eingeht. Gl. (3.25) ist also zu erweitern um einen zusätzlichen exponentiellen Abfall

$$\exp \left(-\frac{6}{\sqrt{5}} \alpha_l \tau \right). \quad (3.48)$$

Wie in Abb. 3.3 b dargestellt, führt Bleaching zu einer scheinbar kleineren Diffusionszeit.

3.2.6 Korrelation mit Untergrund und Übersprechen

In den bisherigen Betrachtungen wurde angenommen, dass das Signal am Detektor nur durch die Fluoreszenz $F_k(t)$ der interessierenden Molekülspezies hervorgerufen wird. In der Realität kommt aber ein Untergrundsignal $U_l(t)$ hinzu, das durch Detektorrauschen, nicht

³Eingesetzt ergibt sich $P_{\alpha,kl}(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) \partial P_{D,\text{free}}(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) / \partial t = P_{\alpha,kl}(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) D_0 \nabla^2 P_{D,\text{free}}(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) + \mathcal{O}(\alpha_l)$, was erfüllt ist, wenn man die Terme in α_l und höher vernachlässigt. Die mittlere Bleichintensität ist über alle Pfade $\mathbf{r}_1 \rightarrow \mathbf{r}_2$ gemittelt nur durch Start- und Endpunkt gegeben, und wegen $0 \leq \Psi_k(\mathbf{r}) \leq 1$ wird das arithmetische durch das geometrische Mittel ersetzt.

vollständig unterdrücktes Anregungslicht, Ramanstreuung an Lösungsmittelmolekülen oder Autofluoreszenz in Zellen hervorgerufen werden kann. Die Korrelationsfunktion Gl. (3.21) lautet dann

$$G_{kl}(\tau) = \frac{\langle (\delta F_k(t) + \delta U_k(t))(\delta F_l(t + \tau) + \delta U_l(t + \tau)) \rangle}{\langle F_k(t) + U_k(t) \rangle \langle F_l(t) + U_l(t) \rangle} \quad (3.49)$$

Die oben genannten Quellen für Untergrundsignal sind in den für FCS relevanten Zeitskalen weder auto- noch kreuzkorreliert mit anderen Signalen – $\langle \delta U_k(t) \delta U_l(t + \tau) \rangle = 0$ und $\langle \delta U_k(t) \delta F_l(t + \tau) \rangle = 0$. Der Einfluss des Untergrundes kann dann in Gl. (3.49) zu einem Faktor zusammengefasst werden:

$$G_{kl}(\tau) = \left(1 + \frac{\langle U_k(t) \rangle}{\langle F_k(t) \rangle} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\langle U_l(t) \rangle}{\langle F_l(t) \rangle} \right)^{-1} \frac{\langle \delta F_k(t) \delta F_l(t + \tau) \rangle}{\langle F_k(t) \rangle \langle F_l(t) \rangle}, \quad (3.50)$$

d. h. die Amplitude der Korrelationsfunktion sinkt mit zunehmendem Untergrundsignal, und die scheinbare Konzentration steigt.

Bisher wurde angenommen, dass die Fluorophore eines Typs nur in einem Detektionskanal Signal erzeugen, d. h. die Farbmatrix Gl. (3.3) besitzt nur Diagonalelemente. Unter realen experimentellen Bedingungen kommt es jedoch fast immer zu Übersprechen z. B. der Fluoreszenz eines mit blauem Laserlicht angeregten grün emittierenden Fluorophors in einen Kanal, der für die rote Emission einer anderen Farbstoffmolekülsorte angepasst ist. Im Falle der Autokorrelation führt dieses Beispiel zu einer zusätzlichen Spezies im roten Kanal, die wie im folgenden Abschnitt zu behandeln ist. Insbesondere bei der Kombination von immobilisierter Fluoreszenz, die Strukturen anfärbt und in Kanal k detektiert wird, und beweglichen fluoreszenten Molekülen, die in Kanal l nachgewiesen werden, kann die immobilisierte Komponente durch Übersprechen ein unkorreliertes Untergrundsignal in l hervorrufen bzw. die bewegliche Komponente die Intensitätsmessung in k verfälschen. Der Einfluss von Übersprechen auf Kreuzkorrelationsfunktionen ist deutlich komplizierter und wird in [152] ausführlich diskutiert.

3.2.7 Korrelation mehrerer Spezies

Nur in den seltensten Fällen liegt in einer Probe nur *eine* fluoreszenzmarkierte Spezies vor. So befinden sich z. B. bei der Untersuchung biochemischer Reaktionen Produkte *und* Edukte in der Lösung, von denen jeweils mindestens eine Teilchensorte fluoreszenzmarkiert sein muss, oder diffundierende Moleküle binden an immobilisierte Strukturen. Die bisher gemachte Annahme, dass einzelne Teilchen nicht miteinander wechselwirken, muss in diesem Zusammenhang verworfen werden, auch wenn sich das System im Reaktionsgleichgewicht befindet. Die Fick'sche Diffusionsgleichung Gl. (3.24) für die Konzentration von Spezies s wird um eine Matrix von Reaktionskonstanten T_{sr} erweitert [39, 71]:

$$\frac{\partial c_s(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D_s \nabla^2 c_s(\mathbf{r}, t) + \sum_{r \neq s} T_{sr} c_r(\mathbf{r}, t), \quad (3.51)$$

der Index r summiert über alle Spezies. Selbst für einfache Zweikomponentensysteme kann keine allgemeine analytische Lösung angegeben werden. Im folgenden werden zwei im Rahmen dieser Arbeit relevante Fälle behandelt.

Nicht oder langsam wechselwirkende Spezies

Es wird zunächst eine Reaktion betrachtet, die so langsam ist, dass eine FCS-Messung einer Momentaufnahme des Systems entspricht⁴. Das bedeutet für eine reversible Reaktion zweiter Ordnung mit einer markierten Spezies A



dass die mittleren Diffusionsraten von A und AB durch den Fokus viel größer sind als die Reaktionsraten bzw. dass $1/\tau_{\text{diff},A}, 1/\tau_{\text{diff},AB} \gg c_B k_{\text{on}} + k_{\text{off}}$. Jetzt können Produkte und Edukte wieder als nicht wechselwirkende Spezies aufgefasst werden, und Fluoreszenzsignale, die von Molekülen unterschiedlicher Spezies herrühren, sind nicht korreliert. Dieser Ansatz ist z. B. in [128] verfolgt worden, um die Bindung des Transkriptionsaktivatorproteins NtrC an DNA zu untersuchen.

Analog zur Herleitung der Korrelationsfunktion einer Spezies setzt sich das Signal am Detektor aus der Summe der Detektorsignale der einzelnen Spezies zusammen, siehe Gl. (3.15):

$$F_k(t) = \sum_s F_{k,s}(t) \quad (3.53)$$

dabei summiert der Index s über die verschiedenen Spezies, k repräsentiert den Detektionskanal. Das mittlere Signal einer Spezies kann dargestellt werden durch das mittlere Signal eines Teilchens dieser Spezies:

$$\langle F_{k,s}(t) \rangle = c_s V \langle f_{k,s}(t) \rangle, \quad (3.54)$$

dabei ist c_s die Konzentration dieser Spezies und V das Probenvolumen. Die Korrelationsfunktion einer Spezies kann ausgedrückt werden durch die Korrelationsfunktion $g_{kl,s}(\tau)$ eines Teilchens im Fokusbereich V_{eff} mit $g_{kl,s}(0) = 1$:

$$G_{kl,s}(\tau) = \frac{1}{c_s V_{\text{eff}}} g_{kl,s}(\tau). \quad (3.55)$$

Die Korrelationsfunktion lautet mit den oben getroffenen Annahmen

$$\begin{aligned} G_{kl}(\tau) &= \frac{\langle \sum_s \delta F_{k,s}(t) \sum_s \delta F_{l,s}(t + \tau) \rangle}{\langle \sum_s F_{k,s}(t) \rangle \langle \sum_s F_{l,s}(t) \rangle} \\ &= \frac{\sum_s \langle \delta F_{k,s}(t) \delta F_{l,s}(t + \tau) \rangle}{\langle \sum_s F_{k,s}(t) \rangle \langle \sum_s F_{l,s}(t) \rangle} \end{aligned} \quad (3.56)$$

und kann mit Gl. (3.54) und Gl. (3.55) umgeformt werden zu

$$\begin{aligned} G_{kl}(\tau) &= \frac{\sum_s \langle F_{k,s}(t) \rangle \langle F_{l,s}(t) \rangle G_{kl,s}(\tau)}{\sum_s \langle F_{k,s}(t) \rangle \sum_s \langle F_{l,s}(t) \rangle} \\ &= \frac{1}{c V_{\text{eff}}} \sum_s \frac{\rho_s \eta_{k,s} \eta_{l,s}}{(\sum_s \rho_s \eta_{k,s} \sum_s \rho_s \eta_{l,s})} g_{kl,s}(\tau). \end{aligned} \quad (3.57)$$

Es bedeuten hier c die Gesamtkonzentration, $\rho_s = c_s/c$ die relative Konzentration und $\eta_{k,s} = f_{k,s}/f_{k,1}$ die relative Quantenausbeute der Spezies s , bezogen auf eine willkürlich, aber fest gewählte Spezies $s = 1$.

⁴Dieser Ansatz erfasst auch nicht miteinander reagierende Teilchen

Insbesondere die Autokorrelationsfunktion setzt sich zusammen aus auf eins normierten Korrelationsfunktionen einzelner Spezies, gewichtet mit dem Anteil an der Gesamtkonzentration und dem Quadrat der molekularen Helligkeit bzw. Quantenausbeute (Abb. 3.3 a).

Austauschgleichgewicht zwischen Diffusion und spezifischer Immobilisierung

Es werden nun frei diffundierende Moleküle A im Gleichgewicht mit immobilisierten Bindungsstellen B betrachtet. Im Falle langsamer Reaktionen, s. o., beobachtet man nur eine frei diffundierende Spezies, die gebundene Fraktion zeigt kein korreliertes Signal und wird gegebenenfalls weggebleicht. Bei einer schnellen Bindung sind die Differenzialgleichungen gemäß Gl. (3.51) mit der Randbedingung $D_B = 0$ zu lösen. Desweiteren wird angenommen, dass A im Überschuss ist: $c_A > c_{AB} \gg c_B$. Im Gleichgewicht ergibt sich $c_{AB}/c_A = c_B k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$. Die Autokorrelationsfunktion für den allgemeinen Fall aus [39, 71] vereinfacht sich dann zu

$$G_{kk}(\tau) = \left(1 + \frac{c_{AB}}{c_A}\right)^{-2} \frac{1}{c_A V_{\text{eff}}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{app}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{app}}}\right)^{-1/2} \quad (3.58)$$

mit

$$D_{\text{app}} = D_A \frac{c_A}{c_A + c_{AB}} \quad \text{und} \quad \tau_{\text{app}} = \frac{w_0^2}{4D_{\text{red}}} = \frac{w_0^2}{4D_A} \left(1 + \frac{c_B k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}\right), \quad (3.59)$$

d. h. der Diffusionskoeffizient wird um den Anteil gebundener Moleküle AB reduziert und die Amplitude wie für unkorrelierten Untergrund korrigiert. Die bindingsbedingte Verlangsamung wird auch in numerischen Simulationen der Diffusion auf Gittern beobachtet [132].

3.3 Untersuchung von behinderter Diffusion in der FCS

Zellkompartimente enthalten Moleküle und Komplexe verschiedener Größenordnungen, die sich frei bewegen können oder Strukturen höherer Ordnung aufbauen. Beispiele sind Strukturproteine wie Filamente, die Skelettfunktionen erfüllen, Membranen, die die Kompartimente begrenzen, oder Polymere wie Chromatin, das in verschiedenen Phasen des Zellzyklus sehr unterschiedlich geometrisch organisiert ist.

Für ein diffundierendes Molekül bilden diese Strukturen Hindernisse, die durch elastische und möglicherweise inelastische Stöße den Random Walk in einer für ihre Geometrie charakteristischen Weise beeinflussen. In einem FCS-Experiment lässt sich dies zumindest prinzipiell beobachten, deshalb werden in diesem Abschnitt statistisch organisierte Hindernisse ohne und mit unspezifischen Bindungen sowie Grenzflächen (Kastenpotenziale in Form von Membranen, Spalten, Kanälen und Kavitäten) und ein harmonisches Potenzial betrachtet.

3.3.1 Diffusion in statistisch organisierten Systemen

Geometrische Strukturen, die nach bestimmten Regeln aufgebaut sind, können mit einem Parameter charakterisiert werden, der die Beobachtung widerspiegelt, dass die Struktur auf verschiedenen Größenordnungen sich selbst ähnlich ist (Skalierungssymmetrie). Der Parameter ist die fraktale Dimension d_f , definiert als der Exponent der Abhängigkeit der Masse M innerhalb einer Kugel des Radius r von eben diesem Radius [20]

$$M(r) \propto r^{d_f}. \quad (3.60)$$

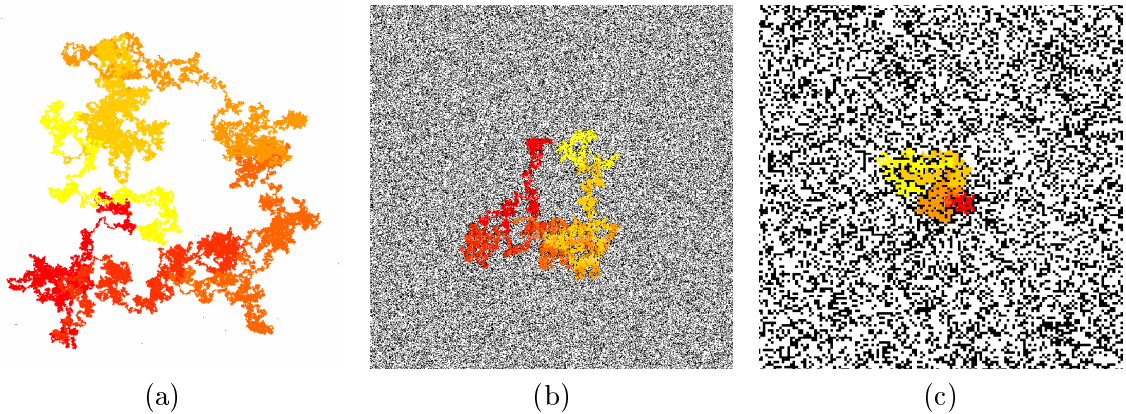


Abbildung 3.5: *Simulierte zweidimensionale Random Walks von 10^6 Schritten auf einem rechteckigen Gitter von 1500×1500 Punkten (a) ohne Hindernisse, (b) mit Hindernissen von 2×2 Punkten und einer Dichte von 35 % und (c) mit Hindernissen von 8×8 Punkten und einer Dichte von 35 %. Abhängig von der Dichte, der Form und der Anordnung der Hindernisse wird der Random Walk „kompakter“ und die abgedeckte Fläche kleiner.*

Die Strukturen werden als Fraktale bezeichnet, weil d_f i. a. nicht ganzzahlig ist. Einfache Beispiele sind eine Gerade mit der fraktalen Dimension $d_f = 1$ oder eine vollständig gefüllte Fläche mit $d_f = 2$. In der Natur kommen streng organisierte Formen sehr selten vor, aber viele statistisch organisierte Systeme besitzen bei räumlicher Mittelung sehr ähnliche Eigenschaften. Dies sind z. B. die zufällige Verteilung von massetragenden identischen „Bausteinen“ einer bestimmten Form auf mögliche Positionen (Abb. 3.5), mit $d_f \simeq 1,88$ in zwei und $d_f \simeq 2,51$ in drei Dimensionen an der Perkolationsschwelle [20] oder ein statistisches Polymerknäuel mit $d_f = 2$.

Systeme mit strengeren Konstruktionsregeln zeigen oft multiskalierendes bzw. multifraktales Verhalten, d. h. sie besitzen einen Satz $d_{f,i}$ von fraktalen Dimensionen bzw. eine kontinuierliche Verteilung für unterschiedliche Größenordnungen, und es existieren Cluster mit einer charakteristischen Korrelationslänge ξ_0 , oberhalb der das System homogen erscheint:

$$M(r) \propto \begin{cases} r^d & \xi_0 < r \\ r^{d_{f,1}} & \xi_1 < r < \xi_0 \\ r^{d_{f,2}} & \xi_2 < r < \xi_1 \\ \vdots & \vdots \end{cases} \quad (3.61)$$

(d ist die Dimension des Raumes). Ob man nun die Verteilung von Hindernissen oder die der nichtbesetzten Positionen betrachtet, wirkt sich nur auf die Zahlenwerte aus, nicht aber auf das Konzept selbst.

Wenn Diffusion oder Transport in einem statistischen System stattfinden kann, spricht man von Perkolation [47]. Übersteigt die Konzentration der Hindernisse c_o einen kritischen Wert, die Perkolationsschwelle $c_{o,p}$, ist ξ_0 für zugängliche Bereiche endlich, und die Bewegung friert ein. Auf einem zweidimensionalen rechteckigen Gitter ist für zufällig verteilte Hindernisse $c_{o,p} \sim 0,41$ (ermittelt mit dem Programm, mit dem Abb. 3.5 erzeugt wurde und [130]) und in drei Dimensionen $c_{o,p} \sim 0,69$ [20]. Diese Angaben beruhen auf der Voraussetzung, dass Hindernisse und die diffundierenden Partikel von gleicher Größe sind. Verändert man dieses Größenverhältnis, so verändert sich auch die Durchlässigkeit

des Systems, d. h. Umgebungen, die kleine Moleküle passieren können, versperren größeren den Weg.

Die in einem solchen System entstehenden großen unzugänglichen Bereiche, Flaschenhälse und Sackgassen existieren auf allen Größenordnungen $< \xi_0$, und daher ist die Brown'sche Bewegung eines Teilchens auf allen Größenordnungen $< \xi_0$ verlangsamt. Die mittlere quadratische Verschiebung steigt nicht mehr linear mit der Zeit an – siehe die Einstein-Beziehung Gl. (3.26) –, sondern gehorcht

$$\begin{aligned} \langle |\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|^2 \rangle &\propto \tau^{2/d_w} \\ &= 2d \frac{w_0^2}{4\tau_{\text{diff}}} \left(\frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} \right)^{2/d_w - 1} \tau \\ &= 2dD(\tau)\tau. \end{aligned} \quad (3.62)$$

Dieses Verhalten, skizziert in Abb. 3.6 a, wird behinderte oder anomale Diffusion genannt und kann mit einem zeitabhängigen Diffusionskoeffizienten

$$D(\tau) = D_0 \left(\frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} \right)^{2/d_w - 1} \quad \text{mit} \quad D_0 = \frac{w_0^2}{4\tau_{\text{diff}}} \quad (3.63)$$

erfasst werden. Der Exponent d_w ist der Anomalieparameter bzw. die fraktale Dimension des Random Walk in der betrachteten Größenordnung w_0 mit $d_w > 2$ ($d_w = 2$ entspricht freier Diffusion, D_0 ist somit der „freie“ Diffusionskoeffizient). In einem FCS-Experiment ist w_0 der Fokusradius. Auch der Random Walk kann multifraktal sein und zeigt crossover-Verhalten [45], d. h. wenn $\langle |\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|^2 \rangle > \xi_0^2$ wird, ist es wieder zeitlinear.

Alternativ kann dies phänomenologisch auch als freie Diffusion mit einer verallgemeinerten Verteilung von Diffusionskoeffizienten $\alpha(D)$ interpretiert werden (auch $\alpha(D) < 0$ ist erlaubt) [109]. In FCS-Experimenten können dann mehr als eine frei diffundierende Komponente gefunden werden.

Im Falle zufällig verteilter Hindernisse beträgt der Anomalieparameter nahe der Perkolationschwelle $d_w \simeq 2,87$ in zwei und $d_w \simeq 3,80$ in drei Dimensionen [130, 20]. Auch bewegliche Hindernisse führen zu anomaler Diffusion, solange ihre Diffusion deutlich langsamer als die der betrachteten Moleküle ist. Ebenfalls nur nahe der Perkolationschwelle sind sowohl analytisch als auch numerisch Beziehungen zwischen d_f und d_w aufgestellt worden [55], die statische und dynamische Eigenschaften verknüpfen. Jedoch sind biologische Systeme i. a. weit von dieser Grenze entfernt.

Nur für unbehinderte dreidimensionale Diffusion in einem unendlichen System ist die Wahrscheinlichkeit für ein Teilchen verschwindend gering, an einen willkürlich gewählten Startpunkt zurückzukehren [126]. Je stärker sich die Behinderung auswirkt, umso größer ist die Rückkehrwahrscheinlichkeit (Long Tail Kinetics), umso kleiner die Zahl der aufgesuchten Positionen pro Zeiteinheit und umso kompakter der Random Walk (Abb. 3.5). Auch diese Effekte können mit weiteren fraktalen Exponenten beschrieben werden.

Auch wenn ein behinderter Random Walk kein Markow-Prozess sein muss, kann heuristisch eine mögliche Übergangswahrscheinlichkeit $P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0)$ angegeben werden, die Gl. (3.62) erfüllt:

$$P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) = \frac{1}{[4\pi D(\tau)\tau]^{d/2}} \exp \left[-\frac{|\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|^2}{4D(\tau)\tau} \right]. \quad (3.64)$$

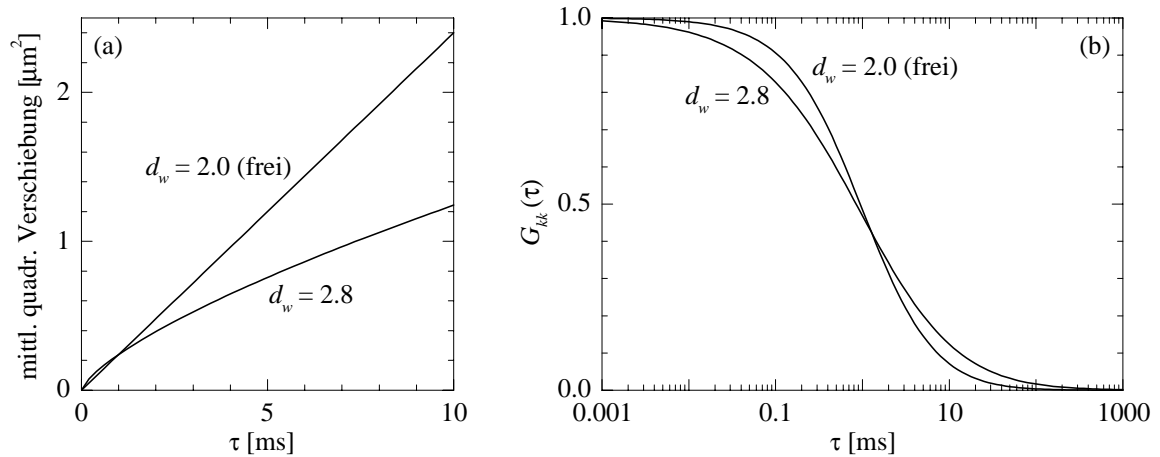


Abbildung 3.6: (a) Mittlere quadratische Verschiebung und (b) Autokorrelationsfunktion für freie und behinderte Diffusion, berechnet nach Gl. (3.62) bzw. (3.65) mit $D_0 = 4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, $w_k = 0,2 \text{ }\mu\text{m}$, $\kappa = 4$ und $\tau_{\text{diff}} = 1 \text{ ms}$.

Ähnlich wie in Abschnitt 3.2.2 folgt daraus die Autokorrelationsfunktion [158] (Abb. 3.6 b)

$$G_{kk}(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left[1 + \left(\frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} \right)^{2/d_w} \right]^{-1} \left[1 + \frac{1}{\kappa^2} \left(\frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} \right)^{2/d_w} \right]^{-1/2}. \quad (3.65)$$

Die folgenden Abschnitte zeigen, dass bei Diffusionsmessungen, die eine charakteristische Größe kennzeichnet – im Fall der FCS ist das der Fokus – das Konzept der anomalen Diffusion auch für andere Ursachen der Behinderung anwendbar ist.

3.3.2 Zusätzliche Bindung

Homogene Bindungsenergie

Die Hindernisse können neben der im vorhergehenden Abschnitt diskutierten Excluded Volume-Wechselwirkung auch Bindungsstellen für die diffundierenden Moleküle besitzen. Wenn nur eine oder wenige spezifische Bindungen vorliegen, verändert dies den effektiven Diffusionskoeffizienten, nicht aber die Behinderung der Diffusion, wie mit numerischen Simulationen [132] und in Abschnitt 3.2.7 gezeigt wurde.

Inhomogene Bindungsenergie – Continuous Time Random Walk

Auch wenn eine nicht zu breite Verteilung von Bindungsenergien $\rho(\epsilon)$ vorliegt, wird das in der FCS beobachtbare Diffusionsverhalten nur vom Einfluss der Hindernisse, nicht aber der Bindungen geprägt [132]. Allerdings gilt dies nur für Systeme im thermischen Gleichgewicht, wird es gestört, so stellt es sich diffusiv wieder ein, wobei die Bindungsstellen die Diffusion zusätzlich behindern.

Kontinuierliche Verteilungen von Bindungsenergien, die breiter als die thermische Energie kT sind, führen zu einer Abweichung von idealem Verhalten *in der Zeit* (im Gegensatz zu den oben beschriebenen inerten Hindernissen, die eine *räumliche* Abweichung bewirken). Eine geeignete Beschreibung kann im Rahmen des Continuous Time Random Walk-Konzeptes gegeben werden [134, 135, 136, 14, 13, 93].

Betrachtet man den Random Walk als Folge von Sprüngen, gehorcht die Sprungwahrscheinlichkeit eines Teilchens in einem idealen System der Verteilung

$$\psi(t) = \alpha e^{-\alpha t} \quad \text{mit} \quad \int_0^\infty dt \psi(t) = 1, \quad (3.66)$$

deren ersten beiden Momente existieren: $\langle t \rangle = \int_0^\infty dt \psi(t)t = 1/\alpha$ und $\langle t^2 \rangle = \int_0^\infty dt \psi(t)t^2 = 2/\alpha^2$. Für alle Verteilungen $\psi(t)$ lässt sich eine mittlere Wartezeit zwischen zwei Sprüngen – hier $\langle t \rangle = 1/\alpha$ – und eine mittlere Zahl von Sprüngen im Intervall τ angeben – hier ist dies $\langle n(\tau) \rangle = \tau/\langle t \rangle = \alpha\tau$. Existiert eine mittlere Sprungweite l , so ergibt dies die Einsteinbeziehung Gl. (3.26) mit $\alpha = 2D_0/l^2$.

Ist eine Vielzahl von Bindungsstellen i mit der Bindungsenergie ϵ_i räumlich zufällig verteilt, so wird ein freies Molekül mit der Wahrscheinlichkeit ξ_i gefangen, und es kann ein gebundenes Molekül mit der Wahrscheinlichkeit $W_i = \alpha \exp(-\epsilon_i/kT)$ entkommen. Die Sprungwahrscheinlichkeit lautet dann

$$\psi(t) = \sum_{i=0}^{\infty} \xi_i W_i e^{-W_i t} \quad \text{mit} \quad \sum_{i=0}^{\infty} \xi_i = 1. \quad (3.67)$$

Für *eine* Bindungsenergie existiert $\tau_j = \langle t \rangle > 1/\alpha$, und ein effektiver Diffusionskoeffizient $D_{\text{red}} < D_0$ beschreibt das Verhalten vollständig, siehe Gl. (3.59).

Bei einer Verteilung der Bindungsenergien, z. B. einer exponentiellen

$$\xi(\epsilon) = \xi_0 e^{-\epsilon/kT_0}, \quad (3.68)$$

deren Breite mit kT_0 charakterisiert werden kann, existiert das erste Moment der Sprungwahrscheinlichkeit nur, wenn der Parameter

$$\beta = \frac{T}{T_0} = \frac{\ln[\xi(\epsilon)/\xi_0]}{\ln[W(\epsilon)/W_0]} \geq 1 \quad (3.69)$$

ist. Das zweite Moment ist nur für $\beta \geq 2$ endlich, wobei β eine fraktale Dimension in der Zeit ist. Asymptotisch lässt sich dann für $\psi(t)$ eine algebraische Funktion angeben [134, 135, 136]:

$$\psi(t) = \frac{\alpha\beta}{(1 + \alpha t)^{1+\beta}}. \quad (3.70)$$

Im Fall $0 < \beta < 1$ führt dies zu einer mittleren quadratischen Verschiebung [13, 93]

$$\langle |\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|^2 \rangle \propto \tau^{\beta 2/d_w}. \quad (3.71)$$

Ein Vergleich mit Gl. (3.62) zeigt, dass die geometrisch bedingte Behinderung der Diffusion verstärkt wird. Dafür kann ein modifizierter Anomalieparameter $\tilde{d}_w = d_w/\beta > d_w$ angegeben werden.

In einer Zelle bedeuten die Gl. (3.67) und (3.68), dass die Dichte von Bindungsstellen relativ groß sein und zahlreiche Bindungsenergien kT deutlich überschreiten müssen, damit $\beta < 1$ erreicht werden kann. Die Strukturen im Zellkern müssen also recht „klebrig“ sein, um experimentell nachgewiesen werden zu können.

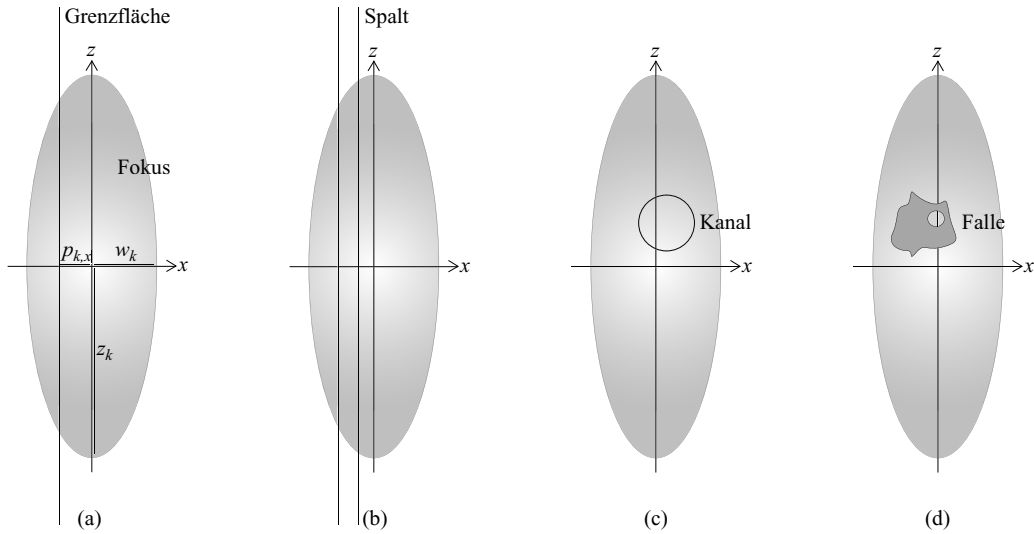


Abbildung 3.7: Grenzflächen, die die Diffusion beeinflussen: (a) Einfache Grenzfläche, (b) Spalt, (c) Kanal, (d) Falle.

3.3.3 Einfluss von Grenzflächen

Einfache Grenzflächen

Ein weiterer Grund für die Behinderung der Beweglichkeit ist die Anwesenheit von undurchlässigen Grenzflächen, z. B. Membranen von Zellkompartimenten. Aktiver Transport oder Diffusion durch Membranen ist i. a. viel langsamer als freie Diffusion, und die Membran ist auf der für FCS relevanten Zeitskala nahezu undurchlässig. Nimmt man vereinfachend an, dass die Membran parallel zur optischen (z -) Achse und senkrecht zur x -Achse des verwendeten optischen Systems bei $x = 0$ liegt (Abb. 3.7), so beschreibt für freie Diffusion ohne Bleaching oder chemische Bindung die Diffusionsgleichung (3.24) mit der Randbedingung

$$\frac{\partial c(\mathbf{r}, t)}{\partial x} = 0 \quad \text{bei} \quad x = 0 \quad (3.72)$$

das Verhalten. Einem Versatz des Fokuspunktes zur Membran wird mit $\mathbf{p}_k \neq 0$ Rechnung getragen, siehe Gl. (3.27). Folgt man dem Lösungsansatz aus [39, 6, 46], so sind Differenzialgleichung und Konzentration einer Fouriertransformation zu unterziehen:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \tilde{c}(\mathbf{k}, t)}{\partial t} &= -D_0 \mathbf{k}^2 \tilde{c}(\mathbf{k}, t) \\ \tilde{c}(\mathbf{k}, t) &= \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \int_{-\infty}^{\infty} dx \int_{-\infty}^{\infty} dy \int_{-\infty}^{\infty} dz \cos(k_x x) e^{i(k_y y + k_z z)} c(\mathbf{r}, t). \end{aligned} \quad (3.73)$$

Dabei ist obige Randbedingung durch die Beschränkung auf \cos -Terme in x -Richtung schon erfüllt. Die Übergangswahrscheinlichkeit $P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0)$ – Gl. (3.25) – ergibt sich dann durch die Rücktransformation, nachdem man die jetzt lineare Differenzialgleichung erster Ordnung mit der Bedingung $c(\mathbf{r}, 0) = \delta(\mathbf{r})$ gelöst hat:

$$\begin{aligned}
P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) &= \frac{1}{4\pi^3} \int_{-\infty}^{\infty} dk_x \int_{-\infty}^{\infty} dk_y \int_{-\infty}^{\infty} dk_z e^{-D_0 \mathbf{k}^2 \tau} \\
&\quad \times \cos(k_x x_2) \cos(k_x x_1) e^{ik_y(y_2 - y_1) + ik_z(z_2 - z_1)} \\
&= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} dk_x e^{-D_0 k_x^2 \tau} (\cos[k_x(x_2 - x_1)] + \cos[k_x(x_2 + x_1)]) \\
&\quad \times \frac{1}{4\pi D_0 \tau} \exp\left(-\frac{(y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}{4D_0 \tau}\right) \\
&= \frac{1}{(4\pi D_0 \tau)^{3/2}} \left[\exp\left(-\frac{(x_2 - x_1)^2}{4D_0 \tau}\right) + \exp\left(-\frac{(x_2 + x_1)^2}{4D_0 \tau}\right) \right] \\
&\quad \times \exp\left(-\frac{(y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}{4D_0 \tau}\right). \tag{3.74}
\end{aligned}$$

Jetzt kann der Beitrag zur Autokorrelationsfunktion für die von der Membran beeinflusste Diffusionsrichtung, x , berechnet werden:

$$\begin{aligned}
g_x(\tau) &= \frac{2}{\pi w_k^2} \frac{1}{\sqrt{4\pi D_0 \tau}} \left[\int_{b_x}^{\infty} dx \exp\left(-2\frac{(x - p_{k,x})^2}{w_k^2}\right) \right]^{-2} \\
&\quad \times \int_{b_x}^{\infty} dx_1 \int_{-\infty}^{\infty} dx_2 e^{-2\frac{(x_1 - p_{k,x})^2}{w_k^2} - 2\frac{(x_2 - p_{k,x})^2}{w_k^2}} \left(e^{-\frac{(x_1 - x_2)^2}{4D_0 \tau}} + e^{-\frac{(x_1 + x_2)^2}{4D_0 \tau}} \right). \tag{3.75}
\end{aligned}$$

Dabei ist $b_x = 0$, wenn sich nur auf einer Seite der Membran, bei $x \geq 0$, fluoreszierende Moleküle befinden, und $b_x \rightarrow -\infty$, wenn sie überall sind. Ausführen der Integrationen ergibt

$$g_x(\tau) = \begin{cases} \frac{1}{\sqrt{\pi} w_k} \left(1 + \frac{4D_0 \tau}{w_k^2}\right)^{-1/2} \left[1 + \exp\left(-4\frac{p_{k,x}^2}{4D_0 \tau + w_k^2}\right)\right] & b_x \rightarrow -\infty \\ \frac{1}{\sqrt{\pi} w_k} \left(1 + \frac{4D_0 \tau}{w_k^2}\right)^{-1/2} \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{\sqrt{2} p_{k,x}}{w_k}\right)\right]^{-1} \\ \quad \times \left\{ 1 + \operatorname{erf}\left(2\frac{p_{k,x}}{w_k} \sqrt{\frac{1+4D_0 \tau/w_k^2}{1+8D_0 \tau/w_k^2}}\right) + \exp\left(-4\frac{p_{k,x}^2}{4D_0 \tau + w_k^2}\right) \right\} & b_x = 0, \\ \quad \times \left[1 + \operatorname{erf}\left(2\frac{p_{k,x}}{w_k} \frac{4D_0 \tau/w_k^2}{\sqrt{(1+4D_0 \tau/w_k^2)(1+8D_0 \tau/w_k^2)}}\right) \right] \end{cases} \tag{3.76}$$

Es ist $\operatorname{erf}(x) = 2\pi^{-1/2} \int_0^x dt \exp(-t^2)$ die normierte Errorfunktion [19]. Um die dreidimensionale Korrelationsfunktion zu erhalten, multipliziert man Gl. (3.76) mit den Beiträgen der anderen Raumrichtungen.

Abb. 3.8 zeigt den Verlauf der Korrelationsfunktion für verschiedene Parameter mit Fluorophoren auf beiden Seiten sowie die Anpassung an das Modell der behinderten Diffusion, Gl. (3.65). Der Verlauf der Kurven für $b_x \rightarrow -\infty$ und für $b_x = 0$ ist nahezu identisch. Sehr nahe an und sehr weit entfernt von Grenzflächen weicht die Diffusion nicht sehr deutlich von unbehindertem Verhalten ab, insbesondere für $\mathbf{p}_k = 0$ erhält man eine „freie“ Korrelationsfunktion mit doppelter Amplitude. In unendlich weiter Entfernung verschwindet der Einfluss der Membran, und die Korrelationsfunktion geht in Gl. (3.33) über. Bei Abständen auf der Skala des Fokusradius ist die Abweichung jedoch deutlich, und auch die aus der Anpassung gewonnene Diffusionszeit steigt an.

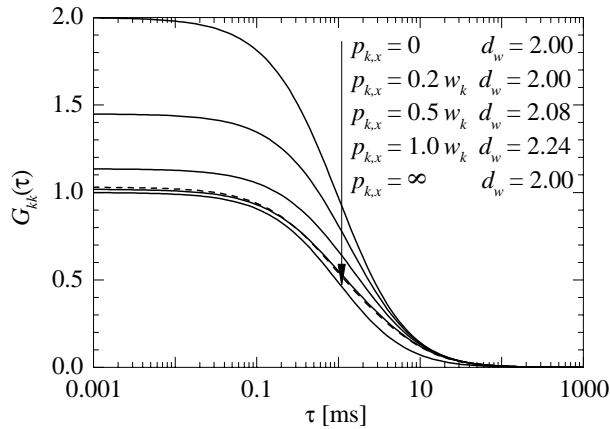


Abbildung 3.8: Korrelationsfunktionen für verschiedene Abstände $p_{k,x}$ in x -Richtung von einer beidseitig von Fluorophoren umgebenen Grenzfläche (durchgezogen) und für $p_{k,x} = w_k$ für eine einseitig von Fluorophoren umgebene Grenzfläche (gestrichelt; Parameter wie in Abb. 3.6): Der Grad der Behinderung ist für große und kleine Abstände vernachlässigbar, bei Abständen auf der Skala des Fokusradius jedoch deutlich.

Kanäle und Spalte

Neben Grenzflächen existieren in Zellen auch ein- oder zweidimensionale Strukturen in Form von Kanälen oder Spalten, deren Inneres ebenso wie die Umgebung diffundierende Moleküle enthalten (Abb. 3.7). Wenn die Größe dieser Strukturen ähnlich der des Fokusbereichs ist, d. h. wenn der Abstand begrenzender Flächen größer oder gleich dem halben Fokusradius in der entsprechenden Raumrichtung ist, kann die Diffusion als ein- bzw. zweidimensionaler Prozess angesehen werden. Die Autokorrelationsfunktionen ergeben sich zu

$$\begin{aligned}
 G_{1D,kk}(\tau) &= \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left(1 + \frac{4D_0\tau}{w_k^2} \right)^{-1/2} \quad (\text{eindimensional}) \\
 G_{2D,kk}(\tau) &= \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left(1 + \frac{4D_0\tau}{w_k^2} \right)^{-1} \quad (\text{zweidimensional}), \quad (3.77)
 \end{aligned}$$

wenn der Kanal oder der Spalt senkrecht zur z -Achse verläuft. Ist der Abstand der begrenzenden Flächen wesentlich kleiner als die Fokusradien, so ist die Korrelationsfunktion in Anwesenheit eines Kanals in guter Näherung eine Summe von Gl. (3.77) und der unbehinderten Korrelationsfunktion Gl. (3.33). Die Diffusion in einem schmalen Spalt und außerhalb der begrenzenden Flächen manifestiert sich in einem FCS-Experiment durch eine Summe von Gl. (3.77) und (3.76).

Auch Korrelationsfunktionen von ein- und zweidimensionalen Diffusionsprozessen, siehe Gl. (3.77) und Abb. 3.9, können mit einem dreidimensionalen Modell der behinderten Diffusion angepasst werden und zeigen eine wesentliche Abweichung von freier dreidimensionaler Beweglichkeit.

Fallen – corraling

Wird ein Raumbereich in drei Dimensionen begrenzt (Abb. 3.7), entsteht eine Kavität, in der ein bestimmter Anteil der untersuchten Teilchen gefangen bzw. eingepfercht ist (Caging bzw. Corraling). Oft besteht eine kleine Wahrscheinlichkeit zur Flucht aus dieser Falle, die eine charakteristische Fluchtzeit τ_{esc} definiert. Die Korrelationslänge der Kavität definiert den Radius R für eine sphärische Näherung.

Für $R \ll w_k$ beobachtet man in einem FCS-Experiment zwei Komponenten, eine schnelle der nicht gefangenen Moleküle mit der freien Diffusionszeit τ_{diff} und eine langsame von gefangenen Molekülen mit der mittleren Aufenthaltsdauer $\sim \tau_{\text{diff}} + \tau_{\text{esc}}$.

Wenn R die Größenordnung des Fokusradius hat, ist die Diffusionsgleichung in radial-symmetrischer Form mit geeigneten Randbedingungen aufzustellen:

$$\begin{aligned} \frac{\partial c(r, t)}{\partial t} &= \frac{D_0}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[r \frac{\partial c(r, t)}{\partial r} \right] \quad \text{mit} \\ \frac{\partial c(r, t)}{\partial r} &= h c(r, t), \end{aligned} \quad (3.78)$$

der Mittelpunkt liegt dabei im Ursprung, und h charakterisiert die Durchlässigkeit der Grenzfläche. Die zugehörige Übergangswahrscheinlichkeit lautet mit den Besselfunktionen $J_0(x)$, $J_1(x)$ [131]

$$P_D(r_2, \tau | r_1, 0) = \frac{1}{(\pi R^2)^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_0(\alpha_n r_2) J_0(\alpha_n r_1)}{J_0^2(\alpha_n R) + J_1^2(\alpha_n R)} \exp(-\alpha_n^2 D_0 \tau), \quad (3.79)$$

die Koeffizienten α_n sind die positiven Lösungen von

$$hR J_0(\alpha R) - \alpha R J_1(\alpha R) = 0. \quad (3.80)$$

Damit ergibt sich eine Autokorrelationsfunktion der Form

$$G_{kk}(\tau) = \frac{1}{c V_{\text{eff}}} \sum_{n=1}^{\infty} \beta_n \exp(-\alpha_n^2 D_0 \tau). \quad (3.81)$$

Im Grenzfall $h \rightarrow 0$ sind die α_n also die Nullstellen von $J_1(x)$, und aus einem multiexponentiellen Fit an die gemessene Korrelationsfunktion lässt sich die Korrelationslänge der Kavität bestimmen, wenn man D_0 kennt. Als Summe von Exponentialfunktionen fällt Gl. (3.81) schneller als die unbehinderte Korrelationsfunktion Gl. (3.33) ab, daher führt eine Anpassung an das Modell der anomalen Diffusion zu einem Anomalieparameter $d_w < 2$.

3.3.4 Harmonisches Potenzial

In komplexen Systemen wie einer lebenden Zelle kommt es neben freier und geometrisch behinderter Diffusion von Molekülen auch zu ihrer Bindung an immobilisierte Strukturen. Dazu gehört auch der gerichtete Transport mit Hilfe von Motorproteinen, der wesentlich langsamer vor sich geht als die Brown'sche Bewegung [160]. Wenn diese Strukturen jedoch selber beweglich sind und beispielsweise als Teil eines Polymernetzwerks eingeschränkter

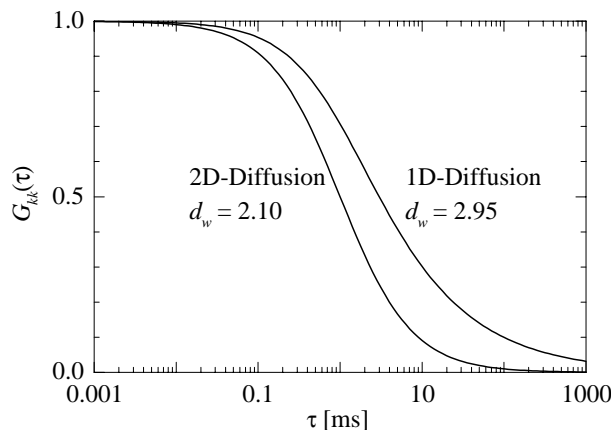


Abbildung 3.9: Ein- und zweidimensionale Korrelationsfunktionen (Parameter wie in Abb. 3.6): Sie lassen sich an das Modell der behinderten Diffusion anpassen, die Abweichung von freier Diffusion ist im zweidimensionalen Fall gering, im eindimensionalen Fall jedoch markant.

Diffusion unterliegen, können mit diesen Strukturen assoziierte Fluorophore Fluktuationen in einem FCS-Experiment hervorrufen.

Im einfachsten Fall findet die Brown'sche Bewegung in einem harmonischen Potenzial der Form

$$U(\mathbf{r}) = \frac{1}{2}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_c)\hat{\mathbf{K}}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_c) \quad (3.82)$$

mit einem Minimum bei \mathbf{r}_c statt. Der Parameter $\hat{\mathbf{K}}$ ist der Tensor der Federkonstanten, der in einem isotropen System eine Konstante k ist. Mit dem Tensor $\hat{\mathbf{\Gamma}}$ der Reibungskoeffizienten, der sich in einem isotropen System auf eine Konstante γ reduzieren lässt, ergibt sich die Bewegungs- oder Langevin-Gleichung

$$\begin{aligned} m \frac{d^2 \mathbf{r}(t)}{dt^2} &= -\nabla U(\mathbf{r}) - \hat{\mathbf{\Gamma}} \frac{d\mathbf{r}(t)}{dt} + \mathbf{F}_{\text{stoch}}(t) \\ &= -\hat{\mathbf{K}}[\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}_c] - \hat{\mathbf{\Gamma}} \frac{d\mathbf{r}(t)}{dt} + \mathbf{F}_{\text{stoch}}(t). \end{aligned} \quad (3.83)$$

Die statistischen Kräfte $\mathbf{F}_{\text{stoch}}(t)$ bewirken eine zufällige Auslenkung aus der Ruhelage.

In einem oben beschriebenen biologischen System kommt es neben Isotropie meist zu überkritischer Dämpfung [122, 121, 59], so dass der Trägheitsterm vernachlässigt werden kann:

$$\gamma \mathbf{v}(t) = \gamma \frac{d\mathbf{r}(t)}{dt} = -k[\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}_c] - \mathbf{F}_{\text{stoch}}(t). \quad (3.84)$$

Daraus resultiert ein zusätzlicher Teilchenfluss $\mathbf{j} = c\mathbf{v} = -c/\gamma \nabla U$, und das zweite Fick'sche Gesetz Gl. (3.24) wird erweitert zur Smoluchowski- oder Fokker-Planck-Gleichung der Diffusion in einem Potenzial

$$\begin{aligned} \frac{\partial c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} &= \frac{1}{\gamma} \nabla [\nabla U(\mathbf{r}) c(\mathbf{r}, t)] + D_0 \nabla^2 c(\mathbf{r}, t) \\ &= \frac{k}{\gamma} \nabla [(\mathbf{r} - \mathbf{r}_c) c(\mathbf{r}, t)] + D_0 \nabla^2 c(\mathbf{r}, t). \end{aligned} \quad (3.85)$$

Die Lösung dieser Differenzialgleichung für ein Teilchen mit der Randbedingung, dass es sich zur Zeit $\tau = 0$ am Ort \mathbf{r}_1 befindet – $P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) = \delta(\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1)$ –, beschreibt den sogenannten Ornstein-Uhlenbeck-Prozess⁵ und ist die Übergangswahrscheinlichkeit [59]

$$\begin{aligned} P_D(\mathbf{r}_2, \tau | \mathbf{r}_1, 0) &= \left(\frac{k}{2\pi D_0 \gamma [1 - \exp(-2k\tau/\gamma)]} \right)^{d/2} \\ &\times \exp \left(-\frac{k}{2D_0 \gamma} \frac{|(\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_c) - (\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_c) \exp(-k\tau/\gamma)|^2}{1 - \exp(-2k\tau/\gamma)} \right) \end{aligned} \quad (3.86)$$

Gl. (3.86) geht für ein verschwindendes Potenzial ($k/\gamma \rightarrow 0$) in Gl. (3.25) über, und die stationäre Gleichgewichtsverteilung lautet

$$W_D(\mathbf{r}) = \lim_{\tau \rightarrow \infty} P_D(\mathbf{r}, \tau | \mathbf{r}_1, 0) = \left(\frac{k}{2\pi D_0 \gamma} \right)^{d/2} \exp \left(-\frac{k}{2D_0 \gamma} (\mathbf{r} - \mathbf{r}_c)^2 \right). \quad (3.87)$$

⁵Der Ornstein-Uhlenbeck-Prozess stellt den einfachsten Fall eines stationären Markow-Prozesses dar, der zu jeder Zeit Gauß-verteilt ist

Die Größe k/γ ist die charakteristische Relaxationskonstante des überkritisch gedämpften Oszillators. Das Verhältnis der Aufenthaltsdauer im Fokus im Falle freier Diffusion $\tau_{\text{diff}} = w_0^2/4D_0$ zur Relaxationszeit statistischer Auslenkungen $\tau_{\text{relax}} = \gamma/k$ ist

$$\eta = \frac{\tau_{\text{diff}}}{\tau_{\text{relax}}} = \frac{w_0^2}{4D_0} \frac{k}{\gamma} \quad (3.88)$$

und um so größer, je stärker das Potenzial ist.

In Analogie zu Abschnitt 3.2.2 kann die Autokorrelationsfunktion faktorisiert werden. Setzt man Gl. (3.86) und (3.87) ein, ergeben sich

$$g_{x,\mathbf{q}}(\tau) = \frac{\eta + 1}{\sqrt{(\eta + 1)^2 - e^{-2k\tau/\gamma}}} \exp \left(4 \frac{q_x^2}{w_0^2} \frac{\eta e^{-k\tau/\gamma}}{(\eta + 1 + e^{-k\tau/\gamma})(\eta + 1)} \right). \quad (3.89)$$

sowie $g_{y,\mathbf{q}}(\tau)$ und $g_{z,\mathbf{q}}(\tau)$ entsprechend. Es ist dabei $\mathbf{q} = \mathbf{x}_c - \mathbf{p}_k$ die Verschiebung von Potenzialminimum und Fokusmittelpunkt. Gl. (3.28) wird zu

$$G_{kk,\mathbf{q}}(\tau) = -\frac{1}{N} + \frac{1}{N} \frac{(\eta + 1)^2 (\kappa^2 \eta + 1)}{[(\eta + 1)^2 - e^{-2k\tau/\gamma}] [(\kappa^2 \eta + 1)^2 - e^{-2k\tau/\gamma}]^{1/2}} \quad (3.90)$$

$$\times \exp \left(4 \frac{q_x^2 + q_y^2}{w_0^2} \frac{\eta e^{-k\tau/\gamma}}{(\eta + 1 + e^{-k\tau/\gamma})(\eta + 1)} + 4 \frac{q_z^2}{w_0^2} \frac{\eta e^{-k\tau/\gamma}}{(\kappa^2 \eta + 1 + e^{-k\tau/\gamma})(\kappa^2 \eta + 1)} \right)$$

Da ein solcher diffundierender Oszillator immer wieder in den Fokus zurückkehrt und sich deutlich langsamer bewegt als ein freies Brown'sches Teilchen, ist Photobleaching zu berücksichtigen. Nur wenn Austausch zwischen strukturgebundenen und freien fluoreszierenden Molekülen stattfindet, stellt sich ein Gleichgewicht ein, und der Bleichprozess kann als reversibel analog zur Besetzung der Triplettzustände betrachtet werden. Genähert ist also Gl. (3.90) mit einem exponentiellen Korrekturfaktor zu versehen:

$$\exp \left(-\frac{\tau}{\tau_{\text{bleach}}} \right). \quad (3.91)$$

Gl. (3.90) mit (3.91) beschreibt für $N = 1$ eine punktförmige diffundierende Struktur.

Der andere Grenzfall ist ein in \mathbf{q} homogen verteiltes Ensemble unabhängiger, gleich heller Oszillatoren, die jeweils als einzelne Spezies betrachtet werden können. Wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, wird die Korrelationsfunktion dann als Summe von Korrelationsfunktionen Gl. (3.90) einzelner Spezies berechnet, gewichtet mit der relativen Konzentration – in diesem Fall $1/V$ – und dem Quadrat der Helligkeit. Die Summe geht über in eine Integration über \mathbf{q} :

$$G_{kk}(\tau) = \frac{\frac{1}{V} \int_V d^3q \int_V d^3r [W_D(\mathbf{r}) \Psi_k(\mathbf{r})]^2 G_{kk,\mathbf{q}}(\tau)}{\left[\frac{1}{V} \int_V d^3q \int_V d^3r W_D(\mathbf{r}) \Psi_k(\mathbf{r}) \right]^2} \quad (3.92)$$

$$= \frac{V}{N} g_x(\tau) g_y(\tau) g_z(\tau) - \frac{V}{N} h_x h_y h_z$$

d.h. der zeitabhängige und der -unabhängige Summand, die sich aus Gl. (3.90) ergeben, können getrennt faktorisiert und berechnet werden. Gl. (3.92) wird zu

$$G_{kk}(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left[\left(1 + \frac{1 - e^{-k\tau/\gamma}}{\eta} \right)^{-1} \left(1 + \frac{1 - e^{-k\tau/\gamma}}{\kappa^2 \eta} \right)^{-1/2} \right. \quad (3.93)$$

$$\left. - \left(1 + \frac{1}{\eta} \right)^{-1} \left(1 + \frac{1}{\kappa^2 \eta} \right)^{-1/2} \right]$$

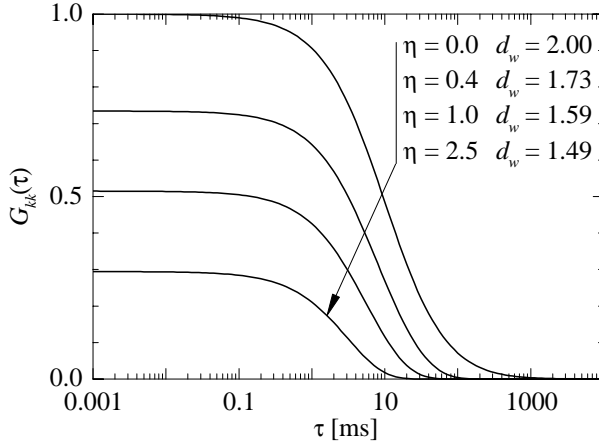


Abbildung 3.10: Korrelationsfunktionen für verschiedene Verhältnisse von freier Diffusions- zu Relaxationszeit mit $D_0 = 4 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, $w_k = 0,2 \text{ } \mu\text{m}$, $\kappa = 4$ und $\tau_{\text{diff}} = 10 \text{ ms}$.

und wird bestimmt durch die mittlere Zahl der Teilchen im Fokus cV_{eff} , die Relaxationszeit γ/k und deren Verhältnis η zur „freien“ Aufenthaltsdauer im Fokus $w_0^2/4D_0$. Auch für eine Verteilung diffundierender Oszillatoren kann Photobleaching genähert mit Gl. (3.91) berücksichtigt werden.

Insbesondere geht Gl. (3.93) in Gl. (3.33) über, wenn das Potenzial verschwindet ($k/\gamma \rightarrow 0$). Die Korrelation bricht zusammen bzw. $G_{kk}(\tau) \rightarrow 0$, wenn das Potenzial groß wird und die Bewegungen einfrieren (siehe auch Abb. 3.10). Darüberhinaus stimmt Gl. (3.93) mit (3.90) für eine laterale Verschiebung von $(q_x^2 + q_y^2)^{1/2} = w_0$ und eine axiale von $q_z = z_0$ überein. Eine Anpassung der Korrelationsfunktionen nach dem Modell der anomalen Diffusion führt zu einem Anomalieparameter $d_w < 2$ und kleineren anscheinenden Diffusionszeiten (Abb. 3.10), da eine gerichtete Bewegung die statistische überlagert. Die mittlere quadratische Verschiebung verläuft also für ausreichend kleine Zeiten mit einer Potenz der Zeit, die größer als eins ist.

Der Parameter d_w erlaubt somit eine Unterscheidung zwischen freier ($d_w = 2$), „passiv“ behinderter ($d_w > 2$) und räumlich eingeschränkter Diffusion ($d_w < 2$).

3.4 Untersuchung von intramolekularen Fluktuationen in der FCS

3.4.1 Nichtstrahlende Zustände am Beispiel EGFP

Wie in Abschnitt 2.2.2 gesehen, kommt es zu Fluktuationen des Protonierungs- bzw. Ionisationszustandes des Chromophors von EGFP (der F64L-S65T-Mutante von Wildtyp-GFP). Nur in der anionischen Konformation B (bzw. im Intermediärzustand I, Abb. 2.7) emittiert EGFP Fluoreszenz oberhalb von 500 nm bei Anregung mit 488 nm. Mögliche Mechanismen der Protonierung sind der Konformationsübergang in die quasineutrale Form A oder die Bindung eines H^+ -Ions aus dem Lösungsmittel. Ein vereinfachtes Termschema zur Beschreibung der Fluoreszenz sieht dann wie in Abb. 3.11 aus [54, 158]: Da die Protonierungsreaktionen nicht photoinduziert sind, sind sie deutlich langsamer als die fluoreszierenden Übergänge [24, 30]. Es stellt sich sehr schnell ein Gleichgewicht zwischen B und B^* ein, die Fluoreszenzintensität ist also proportional zur Besetzung von B: $F_k(t) \propto B(t)$.

Das weitere Vorgehen ähnelt der Berücksichtigung der Triplettbesetzung: Die zeitliche Entwicklung der Besetzungswahrscheinlichkeiten für die drei Zustände A, B (eigentlich

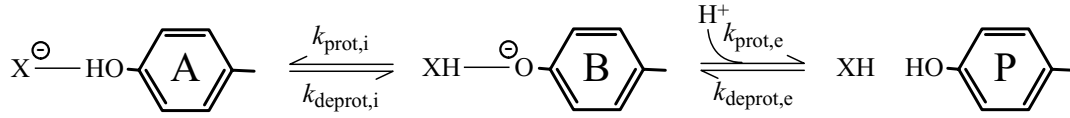


Abbildung 3.11: Vereinfachtes Termschema des Protonierungsgleichgewichts des EGFP-Chromophors (Abb. 2.7). Es ist $P=B-H$.

$B+B^*$) und $P=B-H$ beschreiben die folgenden gekoppelten Ratengleichungen

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} B(t) \\ P(t) \\ A(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -[H^+]k_{\text{prot},e} - k_{\text{prot},i} & k_{\text{deprot},e} & k_{\text{deprot},i} \\ [H^+]k_{\text{prot},e} & -k_{\text{deprot},e} & 0 \\ k_{\text{prot},i} & 0 & -k_{\text{deprot},i} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B(t) \\ P(t) \\ A(t) \end{pmatrix}. \quad (3.94)$$

Zur Korrelationsfunktion tragen nur Moleküle bei, die zur Zeit $t = 0$ ein Photon emittiert haben und sich in B befinden:

$$\begin{pmatrix} B(0) \\ P(0) \\ A(0) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (3.95)$$

Es stellt sich ein Protonierungsgleichgewicht ein. Mit dieser Randbedingung kann der zeitliche Verlauf der Besetzung von B analytisch angegeben werden:

$$B(t) = (1 - \Theta_1 - \Theta_2) + \Theta_1 e^{-\tau/\tau_1} + \Theta_2 e^{-\tau/\tau_2}, \quad (3.96)$$

dabei ergibt sich für die Amplituden und Zeitkonstanten der exponentiellen Zerfälle

$$\begin{aligned} \tau_1 &= ([H^+]k_{\text{prot},e} + k_{\text{deprot},e} + k_{\text{prot},i} + k_{\text{deprot},i})^{-1}, \\ \tau_2 &= \frac{[H^+]k_{\text{prot},e} + k_{\text{deprot},e} + k_{\text{prot},i} + k_{\text{deprot},i}}{[H^+]k_{\text{prot},e}k_{\text{deprot},i} + k_{\text{deprot},e}k_{\text{prot},i} + k_{\text{deprot},e}k_{\text{deprot},i}}, \\ \Theta_1 &= 1 - (k_{\text{deprot},e} + k_{\text{deprot},i})\tau_1 + k_{\text{deprot},e}k_{\text{deprot},i}\tau_1^2, \\ \Theta_2 &= (k_{\text{deprot},e} + k_{\text{deprot},i})\tau_1 + k_{\text{deprot},e}k_{\text{deprot},i}\tau_1\tau_2. \end{aligned} \quad (3.97)$$

Nimmt man weiter an, dass die Übergangsraten nicht von der Beleuchtungsintensität abhängen – dies trifft allerdings nur für kleine Intensitäten zu [54, 139] – und dass sie kleiner als die Diffusionsrate $1/\tau_{\text{diff}}$ sind, kann den Fluoreszenzfluktuationen aufgrund des sich einstellenden Protonierungsgleichgewichts mit einem Korrekturfaktor aus zwei exponentiellen Zerfällen analog zur Triplettkorrektur (Abschnitt 3.2.4) Rechnung getragen werden:

$$\frac{1 - \Theta_1 + \Theta_1 e^{-\tau/\tau_1} - \Theta_2 + \Theta_2 e^{-\tau/\tau_2}}{1 - \Theta_1 - \Theta_2}. \quad (3.98)$$

Da die mittlere Fluoreszenzintensität proportional zur Gleichgewichtsbesetzung $B(\infty)$ ist, charakterisiert das Säure-Base-Gleichgewicht der Protonierung [21] nach

$$\langle F_k(t) \rangle \simeq F_0 + \frac{F_1}{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}}}, \quad (3.99)$$

was auch aus Gl. (3.96) und (3.97) abgeleitet werden kann.

Die Fluktuationen und die mittlere Intensität der Fluoreszenz machen EGFP zu einem möglichen nichtinvasiven Indikator des lokalen pH-Wertes in einer lebenden Zelle.

3.4.2 Lange Makromoleküle

Wenn die Konturlänge L langer Makromoleküle viel größer als die Persistenzlänge l ist, $l \ll L$, können sie als Kette aus $n = L/l$ starren Segmenten (Gauß'sche Kette, freely jointed chain) beschrieben werden [42]. Das Molekül erfährt Konformationsfluktuationen – interne Diffusion. Es kann der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand angegeben werden:

$$\langle R^2 \rangle = nl^2. \quad (3.100)$$

Befindet sich ein Ende am Ort \mathbf{r}_1 , so ist die Wahrscheinlichkeit, das andere Ende am Ort \mathbf{r}_2 zu finden,

$$W_{r,n}(\mathbf{r}_2|\mathbf{r}_1)d^3r_2 = \left(\frac{\beta^2}{\pi}\right)^{3/2} \exp(-\beta^2|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|^2) d^3r_2, \quad (3.101)$$

damit ergibt sich

$$\langle R^2 \rangle = \langle |\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|^2 \rangle = \frac{3}{2\beta^2} \quad \text{oder} \quad \beta^2 = \frac{3}{2\langle R^2 \rangle} = \frac{3}{2nl^2}. \quad (3.102)$$

Lange Makromoleküle in Lösung erfahren Brown'sche Translationsbewegung des Schwerpunktes und räumlich begrenzte Positionsfluktuationen der Molekülenden bezüglich des Schwerpunktes. Markiert man ein Ende einer solchen Kette mit einem Fluorophor, so wird dies in einem anderen Diffusionsverhalten und einer anderen Autokorrelationsfunktion im Vergleich zu einer in der Mitte (also in etwa am Schwerpunkt) markierten Kette resultieren. Ähnliches gilt für Moleküle, die an den Enden mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind: Die Wahrscheinlichkeit, beide Fluorophore gleichzeitig innerhalb eines bestimmten Volumens anzutreffen, wird mit zunehmendem $\langle R^2 \rangle$ geringer. Insbesondere wenn $\langle R^2 \rangle \sim w_0^2$ oder größer ist, wird sich dies auf die Kreuzkorrelationsfunktion zweifarbig markierter Moleküle auswirken.

Im Rahmen des Rouse-Modells [48] werden für alle Segmente einer Gauß'schen Kette die Langevin-Gleichungen aufgestellt. Die Bewegung kann dann nach sogenannten Rouse-Moden entwickelt werden, von denen die nullte die Schwerpunktsbewegung und die erste die Bewegung der Kettenenden relativ zueinander beschreibt. Das Zimm-Modell [48] erweitert diesen Ansatz um hydrodynamische Wechselwirkungen und erlaubt eine Vorhersage, wie der Diffusionskoeffizient und die Relaxationskonstante des End-zu-End-Abstandes von der Anzahl der Segmente abhängt.

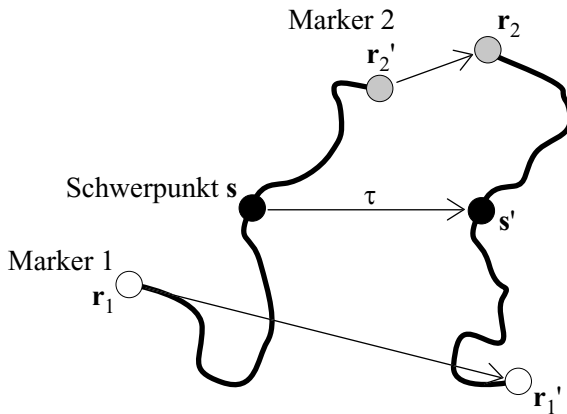


Abbildung 3.12: Die Diffusion eines langen, zweifarbig endmarkierten Makromoleküls führt zu Veränderungen von Position und Form der Kette. Die gezeigte Wahl der Koordinaten dient zur Berechnung der Kreuzkorrelationsfunktion, für die Autokorrelationsfunktion ist \mathbf{r}_1' durch \mathbf{r}_2 zu ersetzen.

Da in einem FCS-Experiment im Gegensatz zu Streuexperimenten nur die markierten Positionen „sichtbar“ sind, wird hier ein vereinfachter Ansatz verfolgt: Die Mitte der Kette wird als Schwerpunkt \mathbf{s} und das Molekül als zwei aneinander geheftete Ketten angenommen (Abb. 3.12). Dann lauten die End-zu-End-Verteilungen der Teilketten

$$\begin{aligned} W_{r, \frac{n}{2}}(\mathbf{s}|\mathbf{r}_1) &= \left(\frac{2\beta^2}{\pi} \right)^{3/2} \exp(-2\beta^2|\mathbf{s} - \mathbf{r}_1|^2) \quad \text{und} \\ W_{r, \frac{n}{2}}(\mathbf{r}_2|\mathbf{s}) &= \left(\frac{2\beta^2}{\pi} \right)^{3/2} \exp(-2\beta^2|\mathbf{r}_2 - \mathbf{s}|^2), \end{aligned} \quad (3.103)$$

die zusammen wieder Gl. (3.101) ergeben:

$$\int d^3s W_{r, \frac{n}{2}}(\mathbf{r}_2|\mathbf{s}) W_{r, \frac{n}{2}}(\mathbf{s}|\mathbf{r}_1) = W_{r, n}(\mathbf{r}_1|\mathbf{r}_2). \quad (3.104)$$

Der Diffusionsprozess setzt sich zusammen aus der Translationsdiffusion des Schwerpunktes von \mathbf{s} nach \mathbf{s}' , beschrieben durch Gl. (3.25)

$$P_D(\mathbf{s}', \tau|\mathbf{s}, 0) = \frac{1}{(4\pi D_0 \tau)^{3/2}} \exp\left[-\frac{|\mathbf{s}' - \mathbf{s}|^2}{4D_0 \tau}\right], \quad (3.105)$$

sowie den internen Fluktuationen der zweiten Teilkette, die von $\mathbf{s} \rightarrow \mathbf{r}'_2$ nach $\mathbf{s}' \rightarrow \mathbf{r}_2$ übergeht (Abb. 3.12). Da sich eine gaußförmige Gleichgewichtsverteilung einstellt, ist auch dies ein Ornstein-Uhlenbeck-Prozess (siehe Abschnitt 3.3.4 und [59]), und die Übergangswahrscheinlichkeit ergibt sich zu

$$\begin{aligned} P_F(\mathbf{r}_2 - \mathbf{s}', \tau|\mathbf{r}'_2 - \mathbf{s}, 0) &= \left(\frac{2\beta^2}{\pi[1 - \exp(-2\delta\tau)]} \right)^{3/2} \\ &\times \exp\left(-2\beta^2 \frac{|(\mathbf{r}_2 - \mathbf{s}') - (\mathbf{r}'_2 - \mathbf{s}) \exp(-\delta\tau)|^2}{1 - \exp(-2\delta\tau)}\right). \end{aligned} \quad (3.106)$$

Damit gilt für die Positionskorrelationsfunktion des End-zu-End-Abstandes $\langle(\mathbf{r}_2 - \mathbf{s})(\tau)|(\mathbf{r}_2 - \mathbf{s})(0)\rangle \propto \exp(-\delta\tau)$, wie in guter Näherung auch das Rouse-Modell postuliert, und in den die Relaxation beschreibenden Parameter δ gehen der mittlere End-zu-End-Abstand, die Zahl der Segmente und der interne Reibungskoeffizient ein [122, 121]. Multipliziert mit den Anfangswahrscheinlichkeiten $W_{r, \frac{n}{2}}(\mathbf{s}|\mathbf{r}_1)$, dass sich der Schwerpunkt bei \mathbf{s} befindet, und $W_{r, \frac{n}{2}}(\mathbf{r}'_2|\mathbf{s})$, dass das andere Kettenende bei \mathbf{r}'_2 liegt, und integriert über alle möglichen Positionen von $\mathbf{r}'_2, \mathbf{s}, \mathbf{s}'$, ergibt sich die resultierende Übergangswahrscheinlichkeit

$$\begin{aligned} P_{DF}(\mathbf{r}_2, \tau|\mathbf{r}_1, 0) &= \int d^3s \int d^3s' \int d^3r'_2 W_{r, \frac{n}{2}}(\mathbf{s}|\mathbf{r}_1) W_{r, \frac{n}{2}}(\mathbf{r}'_2|\mathbf{s}) \\ &\times P_D(\mathbf{s}', \tau|\mathbf{s}, 0) P_F(\mathbf{r}_2 - \mathbf{s}', \tau|\mathbf{r}'_2 - \mathbf{s}, 0) \end{aligned} \quad (3.107)$$

Zur Berechnung der Autokorrelation ist $W_{r, \frac{n}{2}}(\mathbf{r}'_2|\mathbf{s}) = \delta(\mathbf{r}'_2 - \mathbf{r}_1)$, für die Kreuzkorrelation ist Gl. (3.103) zu verwenden. Führt man die Integration nach Gl. (3.21) durch, ergeben sich die Korrelationsfunktionen

$$\begin{aligned} G_{kk}(\tau) &= \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} + \frac{1 - e^{-\delta\tau}}{\beta^2 w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}} + \frac{1 - e^{-\delta\tau}}{\beta^2 \kappa^2 w_0^2} \right)^{-1/2} \\ G_{kl}(\tau) &= \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} + \frac{1}{\beta^2 w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}} + \frac{1}{\beta^2 \kappa^2 w_0^2} \right)^{-1/2} \\ &\times \exp\left(-\frac{d_x^2 + d_y^2}{4D_0\tau + w_0^2 + 1/\beta^2} - \frac{d_z^2}{4D_0\tau + \kappa^2 w_0^2 + 1/\beta^2}\right) \quad (k \neq l). \end{aligned} \quad (3.108)$$

Die beiden Funktionen sind also identisch, wenn man die Verschiebung der Foki vernachlässigt und schnelle intramolekulare Relaxationen annimmt. Dann vereinfacht sich Gl. (3.108) zu

$$\begin{aligned} G_{kl}(\tau) &= \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \left(1 + \frac{2\langle R^2 \rangle}{3w_0^2} + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{2\langle R^2 \rangle}{3\kappa^2 w_0^2} + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}} \right)^{-1/2} \\ &= \frac{1}{cV_{\text{mod}}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{mod}}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa_{\text{mod}}^2 \tau_{\text{mod}}} \right)^{-1/2} \quad \text{mit} \end{aligned} \quad (3.109)$$

$$\begin{aligned} \tau_{\text{mod}} &= \tau_{\text{diff}} + \frac{\langle R^2 \rangle}{6D_0}, \\ \kappa_{\text{mod}} &= \left(\frac{\kappa^2 + 2\langle R^2 \rangle / 3w_0^2}{1 + 2\langle R^2 \rangle / 3w_0^2} \right)^{1/2}, \\ V_{\text{mod}} &= V_{\text{eff}} \frac{\kappa_{\text{mod}}}{\kappa} \left(1 + \frac{2\langle R^2 \rangle}{3w_0^2} \right)^{3/2}. \end{aligned} \quad (3.110)$$

Die resultierende Korrelationsfunktion kennzeichnet also eine kleinere Amplitude ($V_{\text{mod}} > V_{\text{eff}}$), ein kleinerer effektiver Strukturfaktor ($\kappa_{\text{mod}} < \kappa$) und eine verzögerte Diffusionszeit ($\tau_{\text{mod}} > \tau_{\text{diff}}$) bei gleicher Form wie Gl. (3.33). Anschaulich vergrößern die zusätzlichen Fluktuationen das resultierende Fokusbild in alle Richtungen um den gleichen Betrag, so dass es weniger exzentrisch ist und die Diffusionszeit ansteigt.

Um aus einem FCS-Experiment den mittleren quadratischen End-zu-End-Abstand und damit die Persistenzlänge ablesen zu können, genügt manchmal ein Vergleich von Auto- und Kreuzkorrelation von endmarkierten Molekülen, für schnell relaxierende Moleküle müssen die Korrelationsfunktionen von end- und mittig markierten, ansonsten identischen Ketten verglichen werden.

3.5 Andere Methoden der Fluoreszenzfluktuationsspektroskopie

3.5.1 Analyse der Photonverteilung

Typische FCS-Messungen liefern die Konzentration und den Diffusionskoeffizienten von Spezies, die sich in ihren hydrodynamischen Eigenschaften ausreichend unterscheiden. Jedoch variieren die Spezies i. a. auch in ihren Quantenausbeuten, die wesentlich in die Korrelationsfunktionen eingehen, sich aber nicht ohne weitere Messungen z. B. an monodispersen Proben bestimmen lassen.

Es kann aber mit dem gleichen Aufbau, der für FCS verwendet wird und insbesondere die Fluoreszenzdetektion mit Photomultipliern oder Avalanche-Photodioden im Photonzählmodus beinhaltet, das Fluoreszenzsignal von verschiedenen Helligkeitsspezies mit einem fest gewählten Samplingintervall aufgenommen werden. Unter der Annahme, dass der Laser keinerlei Intensitätsschwankungen aufweist, erzeugt dann jede in der Probe vorkommende Intensität I eine durch Shot Noise verbreiterte Zahl von Ereignissen k am Detektor, deren Verteilung durch

$$p(k) = \int_0^\infty \frac{(\eta_I I)^k e^{-\eta_I I}}{k!} p(I) dI \quad (3.111)$$

gegeben ist. Dabei ist η_I die zum Samplingintervall und dem experimentellen Aufbau gehörende Ausbeute des Detektors, $\eta_I I$ damit die mittlere Zahl der Ereignisse bei Intensität I und $p(I)$ die Verteilung möglicher Intensitäten. Man erhält also eine Poissonverteilung, die um mögliche Intensitätsfluktuationen verbreitert ist. Ursachen dafür sind die Teilchenzahlschwankungen im Fokusvolumen, die Diffusion der fluoreszenzmarkierten Teilchen durch das Beleuchtungs-/Detektionsprofil $\Psi_k(\mathbf{r})$, Gl. (3.4), und unterschiedliche Quantenausbeuten verschiedener Spezies.

In den letzten Jahren sind neben einer Analyse der Momente der Verteilung $p(k)$ [123, 124, 100, 102, 101], auch MAFID oder moment analysis of the fluorescence intensity distribution genannt, direkte Methoden zur Interpretation gemessener Verteilungen entwickelt worden: das photon counting histogram bzw. PCH [27, 26, 90], bei dem theoretische Verteilungen direkt an $p(k)$ angepasst werden, oder FIDA bzw. fluorescence intensity distribution analysis [63, 62], bei der die Anpassung auf Basis der Erzeugendenfunktion vorgenommen wird. Alle Verfahren erlauben die Bestimmung relativer Helligkeiten verschiedener diffundierender und immobilisierter Spezies.

3.5.2 Räumliche Korrelationsspektroskopie

Neben der zeitlichen kann auch die räumliche Korrelation von Fluoreszenz von Interesse sein, so z. B. bei der Untersuchung der Verteilung von (nahezu) unbeweglichen Rezeptoren in Zellmembranen. Mit experimentellen Aufbauten zur FCS-Messung und mit CLSM-Geräten sind zwei Ansätze möglich und auch verwirklicht worden: Eine definierte Bewegung der Probe relativ zum Fokus bzw. des Fokus relativ zur Probe wandelt räumliche Schwankungen der Fluoreszenz in zeitliche um (scanning FCS) [112, 114, 69, 10]. Deren Korrelation kann mit geeigneten theoretischen Ansätzen interpretiert werden.

Das andere Konzept beruht auf der Bildaufnahme mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop. Es kann direkt die Korrelation der enthaltenen räumlichen Information berechnet werden (image correlation spectroscopy ICS) [113, 167]. Der Vorteil ist die schnelle Aufnahme größerer Datenmengen, im Vergleich zur scanning FCS allerdings auf Kosten der räumlichen Auflösung.

Typische Ergebnisse der räumlichen Korrelationsspektroskopie sind die Dichte und das Aggregationsverhalten der untersuchten Moleküle, denkbar ist aber auch die Bestimmung räumlicher Korrelationslängen z. B. von diffusionsbehindernden Strukturen, siehe Abschnitt 3.3.1.

3.5.3 Photobleaching-basierte Methoden

Die photoinduzierte Zerstörung von Fluoreszenz kann insbesondere in intrazellulären Anwendungen verwendet werden, um unerwünschte oder unerwünscht helle Fluoreszenz ausbleichen, z. B. bei der Überexpression von hellen GFP-Fusionsproteinen. Darüberhinaus erlaubt die Kinetik des Bleichens und des Ausgleichs gebleichter Fluoreszenz Rückschlüsse auf Diffusions-, Transport- und Bindungsprozesse.

FRAP – fluorescence recovery after photobleaching

Dieser Methode – auch bekannt unter dem Namen fluorescence photobleaching recovery (FPR) – liegt der gleiche experimentelle Aufbau wie der FCS und der CLSM zu Grunde, und sie wurde zur gleichen Zeit wie die FCS in den 1970er Jahren theoretisch und experimentell entwickelt [7, 68].

Ein Bereich oder ein Punkt einer Probe, die fluoreszenzmarkierte Moleküle in freier oder unbeweglicher Form enthält, wird für kurze Zeit durch sehr helle Beleuchtung gebleicht. Anschließend wird der Wiederanstieg des Fluoreszenzsignals durch Diffusion und Austausch zwischen immobilisierten und freien Molekülen unter 300- bis 15 000fach reduzierter Laserleistung als Funktion der Zeit aufgenommen. Eine quantitative Analyse erlaubt die Bestimmung eines effektiven Diffusionskoeffizienten und des immobilisierten Anteils. Zunehmende Verbreitung findet diese Technik, da sie von modernen kommerziellen CLSM-Geräten bereitgestellt wird [164].

FLIP – fluorescence loss in photobleaching

Bei dieser mit FRAP eng verwandten Methode wird Fluoreszenz gleichzeitig gebleicht und detektiert. In CLSM-basierten Systemen werden üblicherweise bestimmte Punkte oder Bereiche einer Probe, z.B. einer Zelle, (nahezu) kontinuierlich gebleicht und an räumlich getrennten Positionen der bleich- und diffusionsbedingte Abfall der Fluoreszenzintensität gemessen [29, 164]. Geschieht beides an der gleichen Position, spricht man auch von continuous fluorescence microphotolysis (CFM) [111]. FLIP ist geeignet, den freien und den immobilisierten Anteil einer Molekülspezies sowie die Eigenschaften der zugehörigen Bindung zu bestimmen. Eine analytische Behandlung ist in der Literatur nicht zu finden.

Kein Austausch: In Abwesenheit von Transportprozessen erhält man aus der Diffusionsgleichung (3.44) ein zeitabhängiges räumliches Profil

$$c(\mathbf{r}, t) = c(\mathbf{r}, 0)e^{-\alpha_k \text{PSF}_{\text{ill},k}(\mathbf{r})t}, \quad (3.112)$$

und das detektierte Signal ist unter Annahme einer gleichförmigen Anfangsverteilung $c(\mathbf{r}, 0) = c_0$

$$\begin{aligned} F_k(t) &= \frac{F_{k,0}}{c_0 V_{\text{eff}}} \int_V d^3r \Psi_k(\mathbf{r}) c(\mathbf{r}, t) \\ &= \frac{F_{k,0}}{V_{\text{eff}}} \int_V d^3r \left(\Psi_k(\mathbf{r}) - \alpha_k t [\Psi_k(\mathbf{r})]^{3/2} + \frac{\alpha_k^2 t^2}{2} [\Psi_k(\mathbf{r})]^2 - \dots + \dots \right), \end{aligned} \quad (3.113)$$

dabei kürzt man $V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} w_k^2 z_k$ ab. Es lässt sich mit $\int_V d^3r [\Psi_k(\mathbf{r})]^{n/2} = V_{\text{eff}}/n^{3/2}$ das Fluoreszenzsignal zusammenfassen zu

$$\begin{aligned} F_k(t) &= \frac{F_{k,0}}{(\alpha_k t)^2} \sum_{n=2}^{\infty} \frac{(-\alpha_k t)^n (n-1)}{n! \sqrt{n}} \simeq \frac{F_{k,0}}{(\alpha_k t)^2} \left(\frac{(\alpha_k t)^2}{2\sqrt{2}} + \sum_{n=3}^{\infty} \frac{(-x\alpha_k t)}{n!} \right) \\ &\simeq \frac{F_{k,0}}{(\alpha_k t)^2} \left[e^{-x\alpha_k t} - 1 + x\alpha_k t - (\alpha_k t)^2 \left(\frac{x^2}{2} - \frac{1}{2\sqrt{2}} \right) \right] \end{aligned} \quad (3.114)$$

mit $x \simeq 1,0634$. Berücksichtigt man, dass die Fluoreszenz im Laufe der Zeit vollständig verschwindet, kann Gl. (3.114) in geschlossener Form approximiert werden:

$$F_{k,\text{immo}}(t) = F_{k,\text{immo},0} \frac{1,0634 \alpha_k t - 1 + e^{-1,0634 \alpha_k t}}{(\alpha_k t)^2}. \quad (3.115)$$

Sind die fluoreszierenden Moleküle jedoch frei beweglich in einem Probenvolumen V , so ist mit der Annahme $\alpha_k \tau_{\text{diff}} \ll 1$ wie in Abschnitt 3.2.5 der Anteil der gebleichten Moleküle

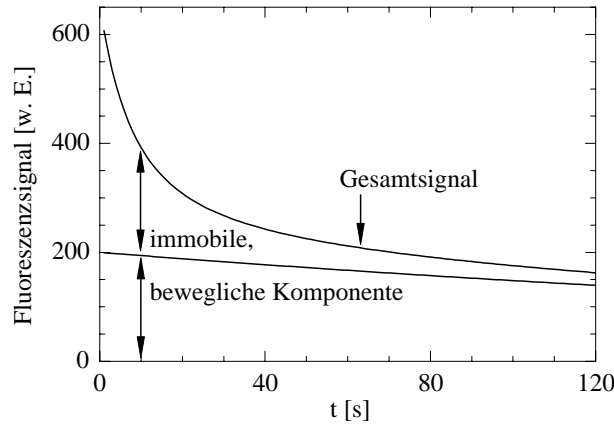


Abbildung 3.13: *Photobleaching-Zerfallskurve des Fluoreszenzsignals in Anwesenheit einer immobilisierten ($F_{k,0} = 800$) und einer frei diffundierenden Komponente ($F_{k,0} = 200$) mit $\alpha = 0,3$ und $V_{\text{eff}} : V \simeq 1 : 35$.*

proportional zur Konzentration, da Verluste durch Bleichung sofort diffusiv ausgeglichen werden, d.h. $c(\mathbf{r}, t) = c(t)$. Damit wird aus Gl. (3.44) und (3.24)

$$\begin{aligned} V \frac{\partial c(t)}{\partial t} &= -\alpha_k \int_V d^3r [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2} c(t) \\ &= -\alpha_k V_{\text{eff}} c(t), \end{aligned} \quad (3.116)$$

und aus dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz

$$F_{k,\text{diff}}(t) = F_{k,\text{diff},0} \exp\left(-\frac{V_{\text{eff}}}{V} \alpha_k t\right). \quad (3.117)$$

Im Fall einer spektralen Spezies mit einer immobilisierten und einer beweglichen Fraktion in einem im Vergleich zum Bleichen langsamen Austauschgleichgewicht beobachtet man also eine Summe der Gl. (3.115) und (3.117) (Abb. 3.13).

Langsamer Austausch: Für ein langsames Austauschgleichgewicht zwischen Diffusion und spezifischer Immobilisierung entsprechend der Reaktionsgleichung (3.52), d. h. wenn $\tau_{\text{diff}} < 1/\alpha_k < 1/k_{\text{off}}$ ist, müssen für die Konzentrationen der frei beweglichen Moleküle $c_{\text{diff}} = c_A$ und der immobilisierten $c_{\text{immo}} = c_{AB}$ die Differenzialgleichungen gemäß Gl. (3.51) aufgestellt werden. Für die bewegliche Fraktion bedeutet das

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_{\text{diff}}(t)}{\partial t} &= -\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2} c_{\text{diff}}(t) \underbrace{-k_{\text{on}} c_B(\mathbf{r}) c_{\text{diff}}(t) + k_{\text{off}} c_{\text{immo}}(\mathbf{r}, t)}_{\substack{0 \text{ außerhalb des Fokus} \\ -k_{\text{on}} \bar{c}_B c_{\text{diff}}(t) \text{ im Fokus}}} \\ &\simeq -(\alpha_k + k_{\text{on}} \bar{c}_B) \frac{V_{\text{eff}}}{V} c(t), \end{aligned} \quad (3.118)$$

dabei wurde angenommen, dass die Diffusion Bindungs- und Bleaching-bedingte Konzentrationsgradienten sehr schnell ausgleicht und die Dichte der Bindungsstellen im Fokus etwa konstant ist, $c_B(\mathbf{r}) \simeq \bar{c}_B$. Daraus folgt ähnlich zu Gl. (3.117) ein zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz

$$F_{k,\text{diff}}(t) = F_{k,\text{diff},0} \exp\left(-\frac{V_{\text{eff}}}{V} (\alpha_k + k_{\text{on}} \bar{c}_B) t\right). \quad (3.119)$$

Die Ratengleichung der immobilisierten Fraktion lautet

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_{\text{immo}}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} &= -\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2} c_{\text{immo}}(\mathbf{r}, t) - k_{\text{off}} c_{\text{immo}}(\mathbf{r}, t) + k_{\text{on}} c_B(\mathbf{r}) c_{\text{diff}}(\mathbf{r}, t) \\ &\simeq -\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2} c_{\text{immo}}(\mathbf{r}, t) - k_{\text{off}} c_{\text{immo}}(\mathbf{r}, t) + k_{\text{on}} \bar{c}_B c_{\text{diff},0}, \end{aligned} \quad (3.120)$$

dabei wurde angenommen, dass auch hier $c_{\text{diff}}(\mathbf{r}, t) \simeq c_{\text{diff}}(t)$, $c_{\text{immo}}(\mathbf{r}, 0) \simeq c_{\text{immo},0}$ und $c_B(\mathbf{r}) \simeq \bar{c}_B$ ist und dass das Bleaching der beweglichen Fraktion sehr viel langsamer verläuft. Die Lösung dieser Differenzialgleichung lautet

$$\begin{aligned} c_{\text{immo}}(\mathbf{r}, t) &= \left(c_{\text{immo},0} - \frac{k_{\text{on}} \bar{c}_B c_{\text{diff},0}}{\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2} + k_{\text{off}}} \right) e^{-\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2} t - k_{\text{off}} t} + \frac{k_{\text{on}} \bar{c}_B c_{\text{diff},0}}{\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2} + k_{\text{off}}} \\ &\simeq c_{\text{immo},0} \left[1 - \frac{k_{\text{off}}}{\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2}} \left(1 - \frac{k_{\text{off}}}{\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2}} \right) \right] e^{-\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2} t - k_{\text{off}} t} \\ &\quad + \frac{k_{\text{off}}}{\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2}} \left(1 - \frac{k_{\text{off}}}{\alpha_k [\Psi_k(\mathbf{r})]^{1/2}} \right). \end{aligned} \quad (3.121)$$

Berechnet man das zugehörige Fluoreszenzsignal analog zu Gl. (3.113) unter Berücksichtigung, dass die Verluste durch Bleaching sehr viel schneller eintreten als durch Dissoziation ($\alpha_k > k_{\text{off}}$), ergeben sich drei Summen wie die in Gl. (3.114), die in entsprechender Weise genähert werden können. Der zeitliche Verlauf der immobilisierten Fluoreszenz ist damit

$$\begin{aligned} F_{k,\text{immo}}(t) &= F_{k,\text{immo},0} e^{-k_{\text{off}} t} \left(\frac{x_1 \alpha_k t - 1 + e^{-x_1 \alpha_k t}}{(\alpha_k t)^2} \right. \\ &\quad \left. + \frac{k_{\text{off}}}{\alpha_k} \frac{x_2 \alpha_k t - 1 + e^{-x_2 \alpha_k t}}{\alpha_k t} - \frac{k_{\text{off}}^2}{\alpha_k^2} [(1 - x_3) \alpha_k t - 1 + e^{-x_3 \alpha_k t}] \right) \end{aligned} \quad (3.122)$$

mit $x_1 \simeq 1,0634$, $x_2 \simeq 0,8389$ und $x_3 \simeq 0,5910$. Das resultierende Fluoreszenzsignal ist die Summe der Gl. (3.119) und (3.122).

Schneller Austausch: Für schnelle Austauschreaktionen zwischen Diffusion und spezifischer Immobilisierung kommt es unter den gleichen Annahmen, die in Abschnitt 3.2.7 gemacht wurden, zu einer verlängerten mittleren Aufenthaltsdauer τ_{app} im Fokus nach Gl. (3.59). Sie setzt sich aus der Wahrscheinlichkeit $c_B k_{\text{on}}$ zusammen, dass ein Molekül an einer Bindungsstelle bindet, und der Aufenthaltsdauer $1/k_{\text{off}}$ dort. Um den Faktor $\tau_{\text{app}}/\tau_{\text{diff}}$ erhöht sich dann die Bleachingwahrscheinlichkeit, und man erhält ein Gesamtfluoreszenzsignal

$$F_k(t) = F_{k,0} \exp \left[-\frac{V_{\text{eff}}}{V} \left(1 + \frac{c_b k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} \right) \alpha_k t \right]. \quad (3.123)$$

In anderen Fällen wie Reaktionen höherer Ordnung oder verschiedenen spezifischen Bindungsstellen sind gekoppelte Diffusionsgleichungen aufzustellen und genähert oder numerisch zu lösen [70].

3.6 Grundlagen der konfokalen Laserscanningmikroskopie

Die Verwendung eines konfokalen Aufbaus für Mikroskopie ist das erste Mal 1957 von M. Minsky konzipiert und realisiert worden. Aber erst die technische Entwicklung der erforderlichen Komponenten hat Mitte der 1980er Jahre zur Entwicklung einfach handhabbarer und schließlich kommerzieller konfokaler Mikroskope geführt [57]. Ihnen ist ein konfokaler Strahlengang zur Beleuchtung und zur Detektion gemeinsam. Das Scannen oder Rastern entweder der Probe durch den Fokus oder des Fokus über die Probe ergibt ein orts aufgelöstes Bild der Intensität $I_B(\mathbf{r})$ (oder auch anderer Signale wie der Fluoreszenzlebensdauer oder spektraler Informationen). Die am weitesten verbreitete Methode ist das Scannen eines konfokalen Fokus mit Hilfe galvanometrischer Spiegelscanner und der abbildenden Optik eines Mikroskops [144], die auch im Rahmen dieser Arbeit realisiert wurde. Andere Konzepte beruhen auf mehreren Foki, die durch Nipkowscheiben bewegt [64, 5] oder mit Spiegelarrays erzeugt werden [156].

3.6.1 Eigenschaften der Abbildung

Neben der Auflösung – Gl. (3.13) – hängt die Qualität einer Abbildung auch davon ab, wie der Kontrast der interessierenden Größe, z. B. der Dichte fluoreszierender Moleküle $\rho(\mathbf{r})$ im Objekt, in das Bild $I_B(\mathbf{r})$ übertragen wird. Der Objekt- und der Bildkontrast sind definiert als

$$K_O = \frac{\rho_{\max} - \rho_{\min}}{\rho_{\max} + \rho_{\min}} \quad \text{und} \quad K_B = \frac{I_{B,\max} - I_{B,\min}}{I_{B,\max} + I_{B,\min}}. \quad (3.124)$$

Im Fall der Rastermikroskopie ergibt sich die Bildfunktion als Faltungsprodukt der Dichteverteilung $\rho(\mathbf{r})$ mit der Detektionswahrscheinlichkeit $\Psi(\mathbf{r})$

$$I_B(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) * \Psi(\mathbf{r}), \quad (3.125)$$

für die fouriertransformierten Größen gilt dann

$$\tilde{I}_B(\mathbf{k}) = \tilde{\rho}(\mathbf{k})\tilde{\Psi}(\mathbf{k}). \quad (3.126)$$

Die Funktion $\tilde{\Psi}(\mathbf{k})$ gibt damit an, wie Amplitude und Phase aus dem Objekt in das Bild transformiert werden und heißt Modulationstransferfunktion MTF [52]. Eine gaußförmige Detektionsfunktion $\Psi(x) \propto \exp(-2x^2/w^2)$ ergibt eine ebenfalls gaußförmige $\text{MTF}(k_x) \propto \exp(-k_x^2 w^2/8)$. Es lässt sich zeigen, dass die MTF gerade den Verlustfaktor beschreibt, den der Kontrast von Objekten der Größe d erleidet:

$$\frac{K_B}{K_O} = \text{MTF}\left(\frac{\pi}{d}\right) \propto \exp\left(-\frac{\pi^2 w^2}{8d^2}\right). \quad (3.127)$$

Der Kontrastverlust von Objekten der Größe Δx_{FWHM} nach Gl. (3.13) beträgt damit fast 60 %.

Die physikalische Größe eines Bildes in der Probe ist durch die Größe des abzubildenden Objektes vorgegeben, so dass als im Rahmen der technischen Möglichkeiten frei wählbarer Parameter die Zahl der Pixel (Bildpunkte) bzw. der physikalische Abstand zweier Pixel bleibt. Das Nyquist-Theorem fordert eine Oversamplingrate von mindestens 2 [161], d. h. der Abstand zweier Pixel sollte höchstens halb so groß wie die kleinste aufzulösende Struktur sein. In der Praxis hat sich 2,3-faches Oversampling bezogen auf die Fokusgröße bewährt, die ja die Auflösbarkeit von Strukturen limitiert. Kennt man die Detektionsfunktion $\Psi(\mathbf{r})$, kann nach Gl. (3.126) die wahre Objektverteilung theoretisch rekonstruiert werden (Deconvolution).

3.6.2 Optisch-mechanische Konzeption eines CLSM

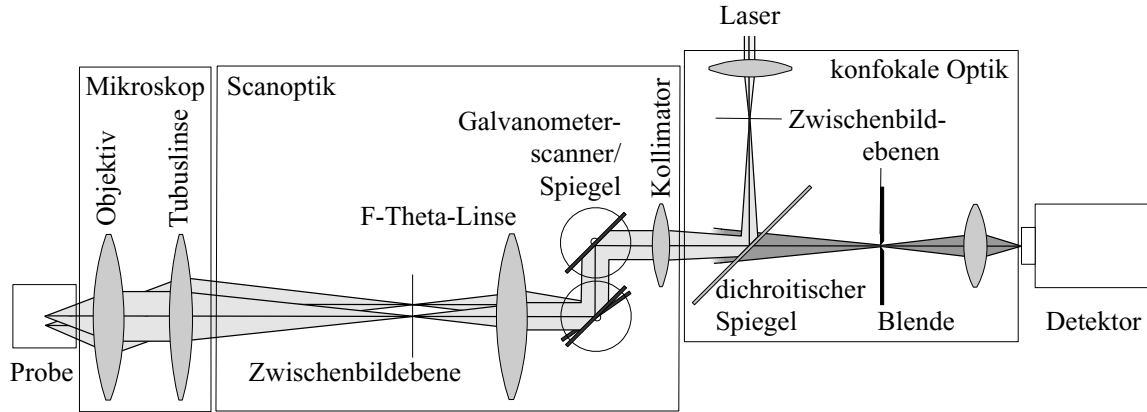


Abbildung 3.14: *Das Prinzip des konfokalen Laserscanningmikroskops: Zwischen die konfokale Optik und das Mikroskop sind apertur- und brennweitenangepasst ein Kollimator, Galvanometerscanner mit Spiegeln und eine F-Theta-Linse eingefügt. Diese wandelt einen Verkipp des Strahls in einen lateralen Versatz in der Zwischenbildebene des Mikroskops um, dessen Optik in einen Versatz in der Probe. Aus Gründen der Anschaulichkeit ist der Detektionsstrahlengang weggelassen, und die Scannerachsen sind beide senkrecht zur Bildebene dargestellt.*

Der in Abschnitt 3.1.1 skizzierte Aufbau zur konfokalen Fluoreszenzanregung und -detektion ist zur Aufnahme von Bildern um eine Scanvorrichtung zu erweitern, wie in Abb. 3.14 gezeigt und in [144] vorgeschlagen: Der anregende Laserstrahl und der Detektionsstrahlengang werden mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels zusammengeführt – dies gewährleistet bereits Konfokalität – und dahinter kollimiert. Der jetzt parallele Strahlengang wird über zwei Spiegel geleitet, die um zwei senkrecht zueinander stehende Achsen durch Galvanometerscanner gedreht und zum zweidimensionalen Positionieren und Rastern verwendet werden können. Die Achsen befinden sich idealerweise in telezentrischer Anordnung zu einem F-Theta-Objektiv, das den verkippten Strahl in einen in der Zwischenbildebene des Mikroskops senkrecht zur optischen Achse verschobenen Fokus abbildet. Abbildungsmaßstab und Vergrößerung des Systems aus Kollimator- und F-Theta-Linse sind im Idealfall eins. Das Mikroskop überträgt dann entsprechend der Abbildungseigenschaften die laterale Verschiebung in der Zwischenbildebene in die Objektebene.

Telezentrischer Strahlengang

Die telezentrische Beleuchtung einer idealen Linse mit parallelen Lichtstrahlen unter dem Winkel Θ zur optischen Achse zeigt Abb. 3.15 a. Wenn der zentrale Strahl des kollimierten Lichts stets durch den Brennpunkt läuft (Brennpunkt als „Drehpunkt“), steht die Symmetrieachse des konvergenten Strahlenbündels immer senkrecht auf der Fokalebene, der zugehörige Öffnungswinkel ist konstant und der Fokuspunkt symmetrisch beleuchtet.

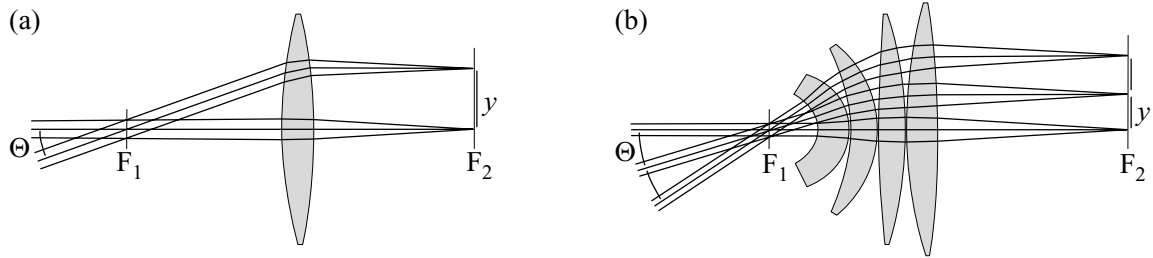


Abbildung 3.15: *Telezentrische Beleuchtung (a) einer idealen Linse und (b) eines F-Theta-Objektivs. Die einfallenden Strahlen verlaufen durch den gegenstandsseitigen Brennpunkt F_1 und werden in der bildseitigen Fokalfäche F_2 fokussiert.*

F-Theta-Objektiv

Eine Linse der Brennweite f wandelt die Schwenkung Θ eines parallelen Strahlbündels in eine Versetzung y des zugehörigen konvergenten um:

$$y = f \tan \Theta. \quad (3.128)$$

Sphärische Fehler typischer Linsen führen für größere Auslenkungen oft noch zu einer gekrümmten Fokalfäche.

Elektromechanisch lassen sich besonders einfach Drehbewegungen erzeugen. Um die Drehbewegungen eines Lichtstrahls in eine lineare Bewegung umzuwandeln, benötigt man mindestens eine Linse. Damit man einen zum Schwenkwinkel proportionalen Versatz erhält, sind sogenannte F-Theta-Objektive entwickelt worden (Abb. 3.15 b), die eine solche lineare Beziehung

$$y = f \Theta \quad (3.129)$$

(daher der Name) und eine sehr ebene Fokalfäche kennzeichnet. Befindet diese sich in der Zwischenbildebene eines Mikroskops, wird der Strahlversatz in einen dem Abbildungsmaßstab entsprechenden Versatz in der Fokalebene des Objektivs transformiert.

Galvanometerscanner

Die besonders häufig und auch hier verwendeten Galvanometerscanner [94] sind für kleine Spiegel, kleine Winkel und hohe Geschwindigkeiten mit einer Drehspule aufgebaut, oder sie besitzen einen drehbaren Eisenkern als Rotor für große Spiegel, große Winkel und mittlere Geschwindigkeiten. Die Scanner sind i. a. tordiert und permanentmagnetisch vorgespannt und gedämpft. Deutlich unterhalb der Resonanz verhält sich der Scanner analog-linear, d. h. die Spiegelposition folgt beliebigem Eingangssignal bezüglich Frequenz, Amplitude und Kurvenform. Eine Positions-Rückmeldung erfolgt i. a. kapazitiv mit geeignet zum Rotor angeordneten Elektroden.

Im Idealfall befinden sich die Achsen beider Scanner telezentrisch im Brennpunkt des Objektivs. Neben der speziellen Konstruktion von mechanisch gekoppelten Scannern oder der Verwendung von Zwischenoptiken kann man sich aber auch behelfen, indem man eine Achse etwas vor und die andere etwas hinter dem Brennpunkt positioniert. Der Fehler ist bei geeigneter Konstruktion vernachlässigbar [144].

Kapitel 4

Das konfokale Fluoreszenzfluktuationsmikroskop

In den ersten FCS-Experimenten wurde der erforderliche konfokale Strahlengang mit optischen Elementen wie Parabolspiegeln und einfachen Linsen aufgebaut [81, 82], jedoch sind in einer solchen Geometrie aufgrund des großen Fokusvolumens bei hohem Untergrund die Teilchenzahlfluktuationen sehr klein. Infolgedessen hat sich die Verwendung von kommerziell erhältlichen Labormikroskopen durchgesetzt, die auch für konfokale Laserscanningmikroskopie verwendet werden und sich durch ein wesentlich kleineres Beobachtungsvolumen und bessere Streulichtunterdrückung auszeichnen.

Insbesondere für *in vivo*-Messungen sind inverse Mikroskope mit auf unendlich korrigierten Objektiven besonders geeignet, da die Probe von unten beobachtet wird. Bauartbedingt minimiert die inverse Geometrie außerdem die Relativbewegung des Objektivs zum Objekt durch äußere Erschütterungen im Laborbetrieb.

In zahlreichen Mikroskop-basierten FCS-Experimenten wird die Fluoreszenzlampe durch eine Lasereinkopplung mit Anpassungsoptik ersetzt und teilweise die Filter und Strahlteiler, die für Epifluoreszenzmikroskopie benötigt werden, auch jetzt zur Trennung des Anregungs- vom Fluoreszenzlicht verwendet. Räumlich weit getrennt davon befinden sich die Detektoren, die außerhalb eines Kameraausgangs positioniert sind [137, 15, 166]. Auch das erste kommerziell erhältliche FCS-Gerät *Confocor1* der Firmen *Zeiss, Jena*, und *Evo-tec, Hamburg*, beruhte auf diesem Konzept.

Aufgrund der räumlichen Trennung der Zwischenbildebenen von Beleuchtung und Detektion gestalten sich die konfokale Justage und deren Stabilität schwierig, daher hat es sich als erfolgreich herausgestellt, Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang über einen gemeinsamen Eingang ins bzw. aus dem Mikroskop zu führen [17], wie es auch beim kommerziellen Nachfolgemodell *Confocor2* realisiert wurde. Außerdem kann das Gerät gleichzeitig im Epifluoreszenzbetrieb z. B. zur Orientierung in Zellen genutzt werden. Der bestehende Aufbau, der im Rahmen dieser Arbeit erweitert wurde, basiert ebenfalls auf diesem Konzept.

Die Integration einer Laserscanningeinheit in den auch für FCS genutzten Strahlengang ist dann der nächste Schritt, um FCS mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu verbinden und insbesondere eine hohe räumliche Auflösung für intrazelluläre Messungen zu ermöglichen [11, 10, 46].

Zahlreiche Messungen dieser Arbeit sind mit dem bestehenden FCS-Modul in Kombination mit einem Schrittmotor-getriebenen Probenstisch und einer Epifluoreszenzeinrichtung

durchgeführt worden. Dabei haben sich die zuverlässige Positionierung des Lasers in der Zelle und die Zuordnung des Diffusionsverhaltens zu intrazellulären Strukturen als äußerst schwierig und aufwändig herausgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit ist der bestehende Aufbau mit einer integrierten, Galvanometer-getriebenen Scanningeinheit erweitert worden, um FCS und CLSM zu vereinen und intrazelluläre Diffusionsmessungen deutlich zu verbessern und zu vereinfachen.

4.1 Anforderungsprofil

Der bestehende Aufbau zur FCS-Messung wurde von Michael Tewes im Rahmen seiner Dissertation konzipiert, entworfen und gebaut [152]. Er realisiert das in Abb. 3.1 skizzierte konfokale Prinzip und die dort angedeutete Modularität: Ein kompaktes Modul, das alle erforderlichen Komponenten enthält, wird seitlich am Kameraausgang eines Mikroskops montiert. Es erfüllt folgende Anforderungen:

- gleichzeitige Messung der Auto- bzw. Kreuzkorrelationsfunktionen zweier mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Spezies,
- Nachweisgrenze für einfach markierte Moleküle von weniger als 1 pM,
- Messungen von in Puffer gelösten Proben ebenso wie in lebenden Zellen,
- Kombination mit Epifluoreszenzmikroskopie,
- beugungsbegrenzter Fokus,
- mechanische Langzeitstabilität, so dass eine Nachjustage weder durch Temperaturschwankungen noch durch im Laborbetrieb unvermeidliche Erschütterungen erforderlich werden,
- Modularität, die einfaches Wechseln von Laserlinien, Filtern und Detektoren oder des gesamten Moduls erlaubt.

Ziel der Erweiterung des Moduls um eine Scanningeinheit ist eine Verbesserung von Anwendungen *in vivo*, insbesondere wird folgendes angestrebt:

- exakte, schnelle und reproduzierbare räumliche Positionierbarkeit in Zellen,
- Automatisierung von FCS-Messungen in Zellen,
- Möglichkeit zur Aufnahme von konfokalen Fluoreszenzbildern in mit kommerziellen Geräten vergleichbarer Qualität,
- Erweiterbarkeit auf weitere Methoden *in vivo* und *in vitro* (PCH, scanning FCS, FRAP/FLIP, FRET bzw. fluorescence resonant energy transfer an einzelnen Molekülen, siehe Abschnitt 3.5),
- Bewahrung der Modularität, insbesondere einfacher Umbau zwischen konventionellem und mit CLSM kombinierten FCS-Betrieb.

4.2 Konzeption des optischen Strahlengangs

Die gesamte konfokale Optik ist bereits in das FCS-Modul integriert, so dass zwischen das Modul und das Mikroskop eine Scanningeinheit eingepasst werden konnte (Abb. 4.2), die die für ein CLSM erforderlichen und in Abb. 3.14 skizzierten Komponenten aufnimmt.

Abb. 4.1 zeigt schematisch den Strahlengang von Mikroskop, Scanningeinheit und FCS-Modul. Das hier verwendete inverse Mikroskop IX70 der Firma *Olympus, Hamburg*, besitzt einen seitlichen optischen Ausgang A zum Anschluss von CCD-Kameras oder Diskussions-einrichtungen, der auch hier verwendet wird. Der Strahlteilerwürfel SW leitet 80 % des vom Objektiv OB über die Tubuslinse TL kommenden Lichts zum seitlichen Ausgang und 20 % über den Spiegel SO zum Okular OK.

Die Zwischenbildebene Z1 liegt im Tubus vor dem Ausgang A und fällt mit der Fokalebene der Scanlinse SL zusammen. Bildseitig liegt die telezentrische Ebene TE der Scanlinse zwischen den Spiegeln der Galvanometerscanner SCX und SCY. Der leichte Verkipf von SCY minimiert dabei die Entfernung der beiden Scannerspiegel voneinander und damit ihren jeweiligen Abstand von der telezentrischen Ebene. Bei Drehung der Scannerspiegel wandert der Fokus in der Zwischenbildebene Z1 sowie in der Objektebene des Mikroskops. Die Kollimations- oder Descanlinse DL fokussiert das Licht auf die Zwischenbildebene Z2, der Aperturwinkel ist dabei der gleiche wie der des bei A aus dem Mikroskop tretenden Lichts. Diese Aperturanpassung erlaubt, die Scanningeinheit, bestehend aus Tubus, Scanlinse, Scannern und Descanlinse, zwischen A und B aus dem Strahlengang auszubauen und das FCS-Modul direkt an den Ausgang A anzuschließen oder bei B eine andere konfokale Optik an die Scanningeinheit zu montieren.

Im FCS-Modul müssen durch den dichroitischen Strahlteiler ST1 zwei konjugierte Zwischenbildebene Z2 erzeugt werden, da sich Lichtquelle und Detektor nicht räumlich überlagern können. ST1 reflektiert das Anregungslicht und lässt das längerwellige Fluoreszenzlicht passieren. Das Licht des Lasers, das über die Faser F eingekoppelt wird, wird mit Hilfe des Kollimators K und der Linse L1 mit angepasster Apertur in die Zwischenbildebene Z2 fokussiert und durch den Anregungsfilter F1 geleitet. Die Strahltaile in Z2 dient als Lichtquelle. Das Fluoreszenzlicht wird durch die die Konfokalität herstellende Lochblende (Pinhole) P in der Ebene Z2 hindurchgeleitet und mit dem Strahlteiler ST2 spektral auf die beiden Detektoren D1 und D2 aufgeteilt. Der kurzwellige Anteil wird reflektiert und durch den Emissionsfilter F2 und die Detektionslinse L2 auf D1 abgebildet. Der langwellige Anteil wird über den Spiegel S und den Filter F3 von der Linse L3 auf D2 abgebildet.

Die lichtempfindliche Fläche der Detektoren hat typischerweise einen Durchmesser von $200\text{ }\mu\text{m}$, so dass die Linsen L2 und L3 lateral justierbar sind, um die richtige Abbildung der Lochblende einstellen zu können. Damit definiert die räumlich feste Blende einen Bezugspunkt für die Justage. Die Linse L1 wird axial und lateral so verschoben, dass Laserstrahltaile und Lochblende konjugiert konfokal angeordnet sind. Auch die Descanlinse DL ist lateral justierbar, damit der dahinter parallele Strahl auch parallel zur und auf der optischen Achse verläuft. Das gesamte FCS-Modul ist mit dem Kreutztisch KT lateral bezüglich der Scanningeinheit verstellbar, um die beiden optischen Achsen zur Deckung zu bringen.

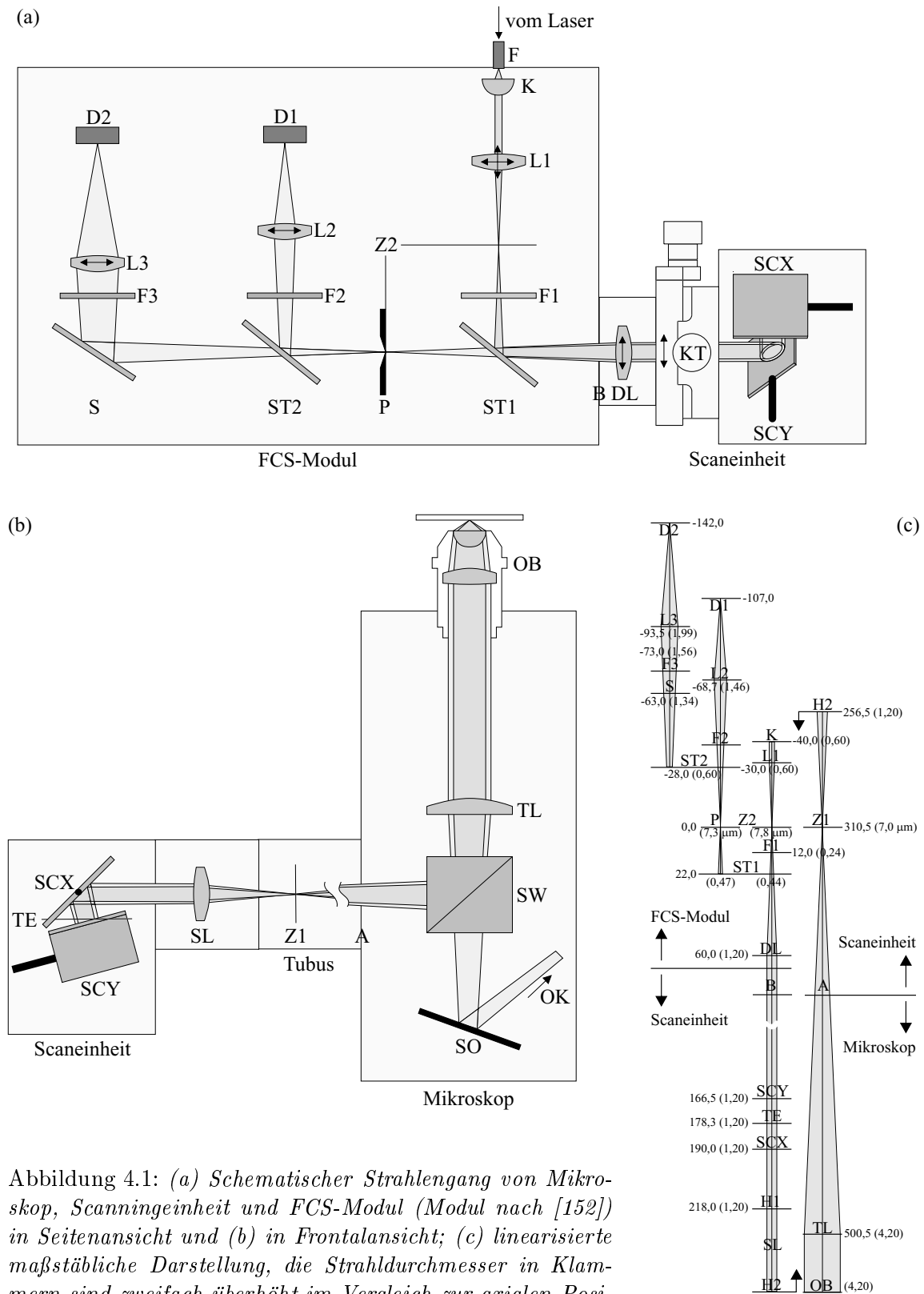


Abbildung 4.1: (a) Schematischer Strahlengang von Mikroskop, Scanneinheit und FCS-Modul (Modul nach [152]) in Seitenansicht und (b) in Frontalansicht; (c) linearisierte maßstäbliche Darstellung, die Strahldurchmesser in Klammern sind zweifach überhöht im Vergleich zur axialen Position (Maße in mm, soweit nicht anders angegeben). Weitere Erläuterungen im Text.

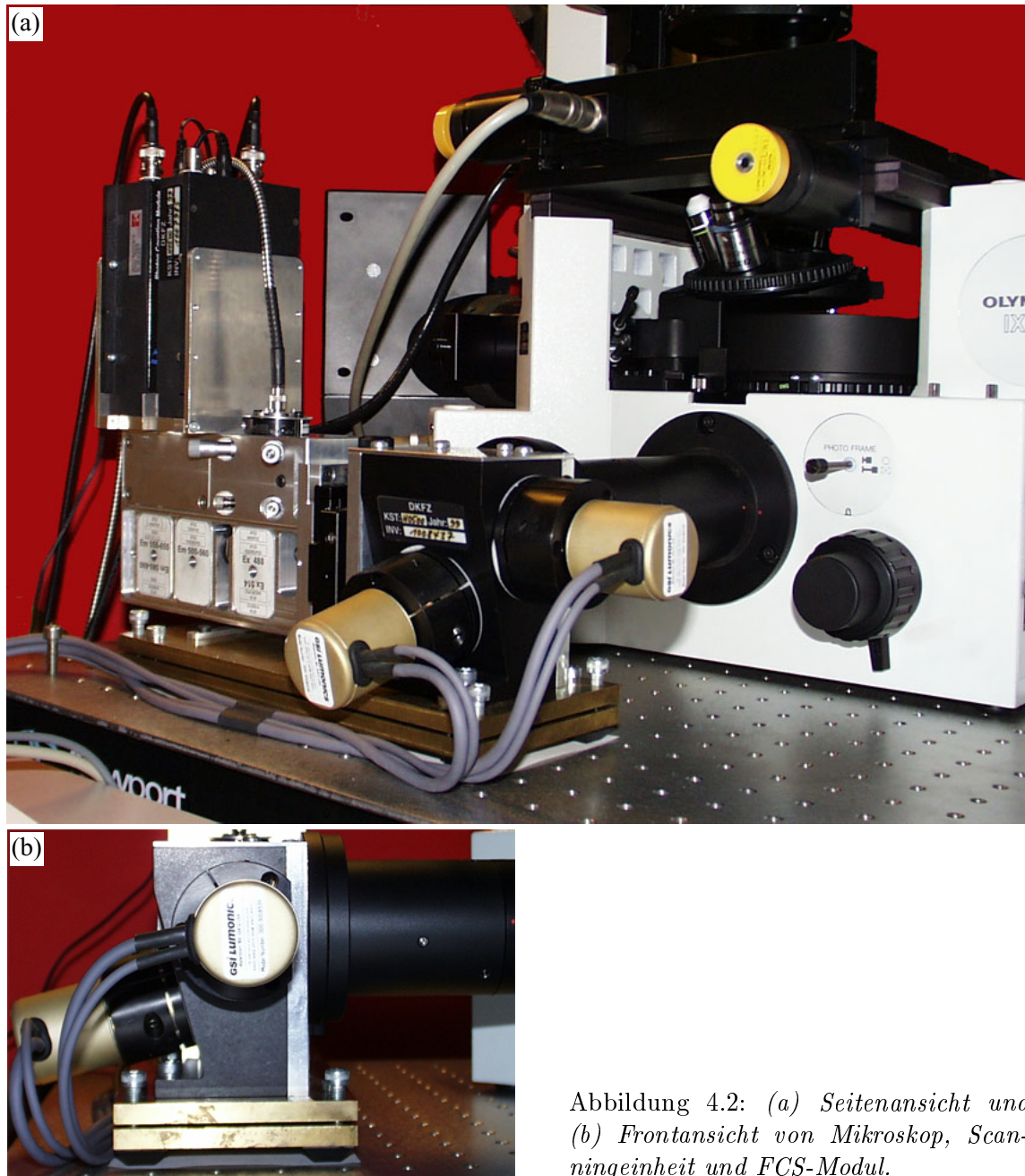


Abbildung 4.2: (a) Seitenansicht und (b) Frontansicht von Mikroskop, Scanningeinheit und FCS-Modul.

4.3 Technische Umsetzung

4.3.1 Auslegung der Optik

Die Dimensionierung des Strahlengangs war bei der Entwicklung des FCS-Moduls durch die Forderung nach einem möglichst kleinen Fokusvolumen sowie durch den Aperturwinkel und die Lage des Zwischenbildes vor dem Ausgang A gegeben. Hinzu tritt der Wunsch nach einer präzisen, schnellen und reproduzierbaren Positionierbarkeit des Fokus in der Probe mit möglichst geringen Abweichungen abseits der optischen Achse. Abb. 4.1c zeigt den aufgefalteten Strahlengang in der Scanningeinheit maßstabsgetreu. Die optischen Eigen-

schaften des bewährten FCS-Gerätes wurden weitgehend beibehalten (Details siehe [152]) und die hinzugefügten Komponenten daran angepasst.

Ausleuchtung des Objektivs: Im Rahmen dieser Arbeit und zur Konzeption des FCS-Moduls wurde das auf unendlich korrigierte Wasserimmersionsobjektiv UPlanApo $60\times/1.2W$ von *Olympus* mit 60facher Vergrößerung und einer NA von 1,2 verwendet. Es können aber auch andere Objektive eingesetzt werden. Die Eingangsapertur hat einen Durchmesser von 9 mm. Die Optik ist so ausgelegt, dass der $1/e^2$ -Radius der Intensität des Gauß'schen Strahlprofils diesen Durchmesser nicht übersteigt. Diese Anforderung wurde für die Scannerweiterung übernommen, obwohl eine überbeleuchtete Eingangsapertur zu einem etwas kleineren Fokusbild führt (siehe Abschnitt 3.1.2), aber mit dem Vorteil, dass so nur ein geringer Teil des Lichts abgeschattet wird. Die Tubuslinse TL (Brennweite $f_{TL} = 190$ mm) erzeugt ein reelles Bild in der Ebene Z1 mit einer Strahldivergenz von $\alpha \leq \arctan(4,5/190) = 1,36^\circ$ ($NA \leq 0,024$).

Scan- und Descanlinse: Als Scanlinse SL kommt das F-Theta-Objektiv FVX-IR-PL von *Olympus* zur Verwendung (Abb. 4.3), das auch von kommerziellen Anbietern (*Olympus*, *Till Photonics*, *Martinsried*) für CLSM-Geräte verwendet wird. Es besteht aus drei Linsengruppen, einem Singulett und zwei Dubletts, und zeichnet sich durch ein breites Transmissionsspektrum von <400 bis >1000 nm mit geringen chromatischen Fehlern aus. Setzt man es in F-Theta-Geometrie ein, so ist der Strahlengang nicht mehr vollständig telezentrisch, d. h. die Symmetrieachse des Strahlenbündels in der Fokalebene ist nicht mehr parallel zur optischen Achse.

In Kombination mit dem Fototubus IX-SPT (*Olympus*), der direkt an den Ausgang A montiert werden kann, liegt die Fokalebene des Scanobjektivs korrekt in der Zwischenbildebene Z2 78,5 mm vor dem Korpus des Mikroskops. Die Vergrößerung beträgt $\tan \Theta / \tan \Theta' = 3,33$ und die effektive Brennweite $f_{SL} = 54$ mm (Abb. 4.3). Damit hat der an die Objektivausleuchtung angepasste Strahl einen Durchmesser von $\leq 2,6$ mm in der Scanningeinheit.

Als Descanlinse wird hinter den Scannern ein Achromat DL mit $f_{DL} = 60$ mm verwendet, der den parallelen wieder zu einem konvergenten Strahl mit einem Öffnungswinkel von $\alpha \leq 1,22$ ($NA \leq 0,021$) fokussiert. Der Brennpunkt liegt in der Zwischenbildebene Z2. DL ist lateral justierbar, damit das Licht auf der optischen Achse aus dem FCS-Modul in die Scanningeinheit tritt.

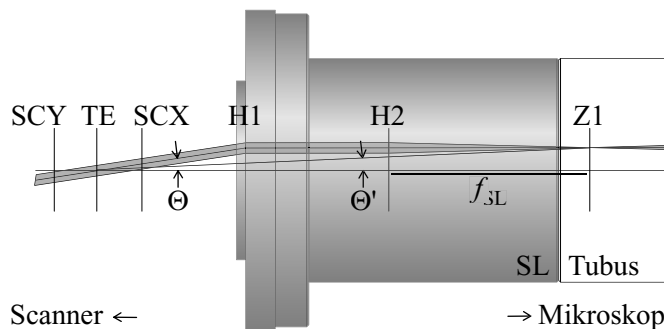


Abbildung 4.3: Maßstabsgetreuer Strahlengang durch das Scanobjektiv bei der maximalen verwendeten Auslenkung aus der optischen Achse (6 mm): Die Angaben für Vergrößerung und effektive Brennweite erlauben die Betrachtung als einfache Linse mit den Hauptebenen H1 und H2.

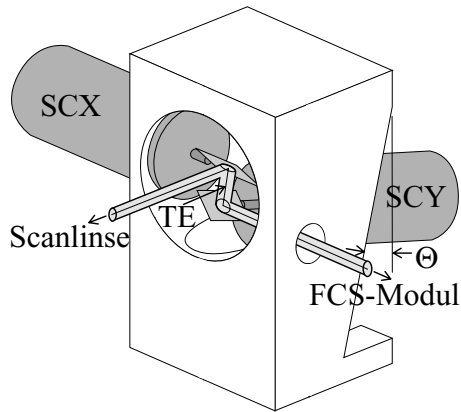


Abbildung 4.4: Die Galvanometerscanner sitzen auf einem vorkonfektionierten Block, der so in den Strahlengang eingepasst wird, dass die telezentrische Ebene der Scanlinse zwischen den Spiegeln liegt. Der Verkipf von SCY um $\Theta = 15^\circ$ erlaubt einen kleineren Abstand der Spiegel.

Galvanometerscanner: Es kommen zwei Drehmagnet-Galvanometerscanner des Typs M2 von *GSI Lumonics, Unterschleißheim*, zur Verwendung, die auf einem Aluminiumrahmen vormontiert sind (Abb. 4.4). Die Drehachse des Scanners SCY ist um 15° aus der Horizontalen verkippt, um einen möglichst kleinen Abstand der Spiegel zu erreichen. Auf der optischen Achse beträgt er 23,5 mm. Das Licht trifft als parallele Strahlen aus der Scanlinse auf die Spiegel und wird in die Scanlinse geleitet, dabei liegt deren telezentrische Ebene genau zwischen den Spiegeln. Die weiteren optomechanischen Eigenschaften können Tab. 4.1 entnommen werden. Über thermische Drift, Jitter und Wobble¹ wurden seitens des Herstellers keine Angaben gemacht.

Eigenschaft	Wert	bei
Reflektivität der Spiegel	>96 %	450–700 nm
maximale Auslenkung (mech.)	$\pm 15^\circ$	
Winkelreproduzierbarkeit (mech.)	12 μrad	$\pm 15^\circ$
Abweichung von der Linearität	0,06 %	$\pm 15^\circ$

Tabelle 4.1: Die optomechanischen Eigenschaften der M2-Scanner gemäß den Testblättern der ausgelieferten Exemplare.

Lasereinkopplung: Die Monomodenfaser F (Modell FDS-BS-10-S-488-S von *Laser 2000, Wessling*), in die das Licht des Lasers eingekoppelt wird, besitzt mit der $\text{NA}=0,11$ einen Divergenzwinkel von $6,3^\circ$. So tritt aus dem kombinierten Einkoppler/Kollimator A-12-VIS (*Linos, Göttingen*) ein paralleler Strahl mit einem Durchmesser von 1,2 mm und aus dem Achromaten L1 ($f_{L1} = 30 \text{ mm}$, *Linos*) ein konvergenter Strahl mit $\alpha = 1,15^\circ$ ($\text{NA} = 0,020$), die Aperturwinkel von FCS-Modul, und Scanningeinheit und Mikroskop sind also im Rahmen der käuflich erhältlichen Komponenten aufeinander angepasst. Um die Strahltaile auf der optische Achse des Moduls und in der Zwischenbildebene zu positionieren, deren Schnittpunkt die Idealposition darstellt, kann der Achromat lateral und axial mit Mikrometernaufklärung justiert werden (Abb. 4.5). Von einer Justiermöglichkeit der Fasereinkopplung wurde aus Stabilitätsgründen abgesehen, da für kleine Abweichungen von der optischen Achse die Asymmetrie der Beleuchtung vernachlässigbar ist.

¹Beim Überstreichen der Scanlinie mit konstanter Geschwindigkeit kommt es zu statistischen Abweichungen, die parallel Jitter und senkrecht Wobble heißen, i. a. gleich der Winkelreproduzierbarkeit

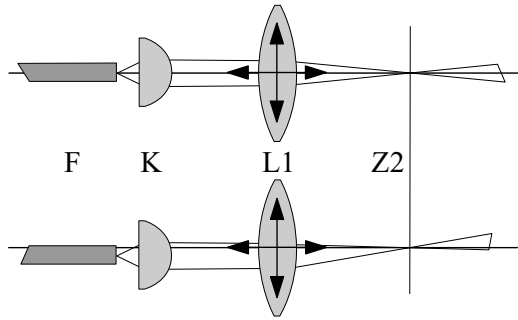


Abbildung 4.5: Die konfokale Justage des FCS-Moduls erfolgt durch Verschieben der Linse L1, bis die Strahltaile im Schnittpunkt von optischer Achse und Zwischenbildebene Z2 liegt. Wenn die mögliche resultierende Verkippung zu groß wird, müssen Faser F und Kollimator K ebenfalls verschoben werden.

Detektionsstrahlengang: Idealerweise ist der Lochblendenradius gleich dem $1/e^2$ -Radius der $\text{PSF}_{\text{det}}(\mathbf{r})$ in der Zwischenbildebene. Experimentell hat sich jedoch eine $50\,\mu\text{m}$ -Lochblende als jene mit dem besten Signal- zu Rauschverhältnis erwiesen [152], damit auch Intensitäten der Maxima erster Ordnung der Beugung an der kreisförmigen Austrittsblende des Objektivs erfasst werden. Die Linsen L2 und L3 ($f_{L2} = 30\,\text{mm}$, $f_{L3} = 25\,\text{mm}$, Linos) verkleinern das Pinhole um einen Faktor von ca. 4,5 auf die Detektorfläche, die bei den verwendeten aktiv gequenchten Avalanche-photodioden des Typs SPCM-AQR (Perkin-Elmer Optoelectronics, Vaudreuil, Canada) einen Durchmesser von mehr als $150\,\mu\text{m}$ besitzen. Diese Dioden zeichnen sich durch eine im Vergleich zu Photomultipliern besonders hohe Nachweiseffizienz aus (Abb. 4.6) [110].

Laser und Filter: Fluorophore, Anregungswellenlängen und Emissionsfilter müssen bei Zweifarben-FCS und -CLSM so gewählt werden, dass eine möglichst hohe Detektionseffizienz bei minimiertem Übersprechen der Detektionskanäle erreicht wird. Die Anregung erfolgt mit einem Argon-Krypton-Laser Omnichrome 643-50YB (Melles Griot, Bensheim), der bei $488\,\text{nm}$ eine Leistung von $27\,\text{mW}$ und bei $568\,\text{nm}$ von $39\,\text{mW}$ liefert. Damit lassen sich zahlreiche in biologischen Experimenten verwendete Fluorophore und autofluoreszente Proteine (Abschnitt 2.2) anregen. Die in Tab. 4.2 aufgeführten Filter und Strahlteiler (Omega Optical, Brattleboro, VT/USA) erfüllen die Anforderungen recht gut, insbesondere ist das Übersprechen typischer Fluorophore vom grünen in den roten Kanal $< 10\%$ [152], während die Volumenüberdeckung der Foki noch 79% beträgt (Abschnitt 3.2.3). Die effektiven Transmissionraten der Detektionskanäle, kombiniert aus den Eigenschaften der Filter F2 und F3 und des Strahlteilers ST2, zeigt Abb. 4.6.

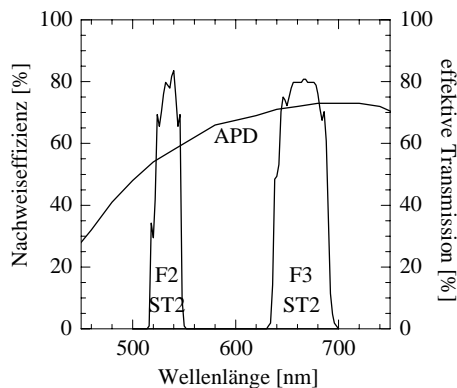


Abbildung 4.6: Die spektrale Nachweiseffizienz der Avalanche-photodioden des Typs SPCM-AQR (linke Achse) und die effektive Transmission der Detektionskanäle als Produkt der Filtertransmission mit der Reflektivität des Strahlteilers ST2 für F2 bzw. mit der Transmission von ST2 für F3 (rechte Achse) gemäß den Datenblättern.

Komponente	Bezeichnung	T > 50 %
F1	490-577DBEX	481–497, 560–585 nm
F2	530DF30	515–545 nm
F3	660DF50	635–685 nm
ST1	490-575DBDR	500–562, 600–680 nm
ST2	570DRLP02	565–900 nm

Tabelle 4.2: *Bezeichnung und Transmissionsverhalten der verwendeten Filter und Strahlteiler gemäß Herstellerspezifikationen [96].*

4.3.2 Mechanischer Aufbau

Die optischen Bauelemente des konfokalen Strahlengangs sind in einen kompakten, aus massivem Aluminium gefertigten Träger integriert (weitere Details siehe [152] und Abb. 4.2). Zu erwähnen sind die Filter-/Strahlteilermodule, die einfach gewechselt werden können, die Mikrometerschrauben und die Welle, mit deren Hilfe die konfokale Justage vorgenommen wird, sowie die räumlich fixierte Lochblende.

Die Scanlinse SL ist mit Hilfe des vorkonfektionierten Tubus am Ausgang A des Mikroskops montiert und mit dem Träger der Galvanometerscanner verschraubt. Dieser wiederum ist auf einem vollständig justierbaren Messingtisch befestigt und über zwei Adapterplatten mit dem Kreutztisch KT verbunden. Auf dessen anderer Seite befinden sich zwei weitere Adapterplatten, die auch die Descanlinse DL und die zugehörige Justagemöglichkeit senkrecht zur optischen Achse mit zwei Mikrometerschrauben aufnehmen. An diese letzte Adapterplatte wiederum wird das FCS-Modul geschraubt. Ersetzt man diese Platte durch eine an den Kameraausgang des Mikroskops angepassten Flansch, so kann das FCS-Modul alternativ direkt an das Mikroskop montiert werden.

Schrittmotorgesteuerte Positionierung: Bevor es zur Realisierung der Scanningeinheit kam, ist zur Positionierung der Probe relativ zum Fokus ein Schrittmotor-getriebener Probenstisch (*Märzhäuser, Wetzlar*) verwendet worden. Die Positioniergenauigkeit liegt bei ca. $0,2\ \mu\text{m}$, allerdings ist die Reproduzierbarkeit der Position durch mechanische Hysterese deutlich größer als $1\ \mu\text{m}$. Für eine großräumige Positionierung in der Probe wird der Tisch weiterhin verwendet. Auch die Fokussierung des Objektivs auf die gewünschte Objekzebene geschieht mit Hilfe eines Schrittmotors (*Olympus*), der an den Feintrieb des Fokussierendes des Mikroskops angeschlossen ist. Aufgrund der starken Untersetzung ist die Positioniergenauigkeit entlang der optischen Achse ca. $10\ \text{nm}$.

4.3.3 Die Elektronik zur Steuerung und Datennahme

Einen Überblick über das Schaltschema der Steuer- und Messelektronik für kombinierte FCS- und CLSM-Messungen zeigt Abb. 4.7.

Die Korrelatorkarte: Zur Aufnahme der Korrelationsfunktionen dient der Echtzeitkorrelator ALV-5000/E (*ALV-Laser, Langen*) mit zugehöriger Software, der als PC-kompatible Steckkarte ausgeführt ist und die gleichzeitige Berechnung der Autokorrelationen zweier Signalkanäle oder ihre Kreuzkorrelation in Echtzeit erlaubt. Die Berechnung beruht auf folgendem Prinzip [4]:

- i) Zählen der eingehenden Impulse $n_{k,i}, n_{l,i}$ der beiden Kanäle über N Zeitintervalle t_i mit $t_{i+1} - t_i = t_s$,
- ii) Verzögern der Zählraten um die Zeit $\tau = j t_s$,
- iii) Multiplikation der aktuellen und der verzögerten Zählraten und
- iv) Aufsummieren dieser Produkte.

Hardwareseitig werden die letzten beiden Schritte für zahlreiche kurze Verzögerungszeiten gleichzeitig durchgeführt, für lange Verzögerungen geschieht dies softwareseitig. Darüberhinaus steigt die Breite der Intervalle mit der Verzögerungszeit an, die kleinste beträgt 200 ns, die größte hängt von der Gesamtmesszeit ab. Damit wird die diskrete Korrelationsfunktion berechnet:

$$g_{kl}(j) = \sum_{i=1}^N n_{k,i} n_{l,i-j}, \quad (4.1)$$

für die normierte Korrelationsfunktion wird die sogenannte symmetrische Normierung angewandt, die die Standardabweichung reduziert:

$$G_{kl}(j) = \frac{N g_{kl}(j)}{M_0 M_j} - 1 \quad \text{mit} \quad M_0 = \sum_{i=1}^N n_{k,i} \quad \text{und} \quad M_j = \sum_{i=1}^N n_{l,i}. \quad (4.2)$$

Die Windows-basierte Software stellt die Korrelationsfunktionen und die mittleren Zählraten in Echtzeit dar, die abschließend in einer Textdatei zur weiteren Verarbeitung abgespeichert werden können. Über betriebssystemverwaltete Kommunikation zwischen Prozessen kann die Aufnahme und Speicherung von Korrelationsmessungen aus anderen Programmen heraus gesteuert werden.

Die Zähler-/Timerkarte: Da die gemessene Zählrate von der Korrelatorkarte nicht mit der gewünschten Samplingrate (bis ca. 1 MHz) für Scanningmikroskopie und weitere Methoden wie PCH oder smFRET (Abschnitt 3.5) zur Verfügung gestellt wird, kommt die PC-kompatible Zähler-/Timerkarte PCI-6602 von *National Instruments, München*, zur

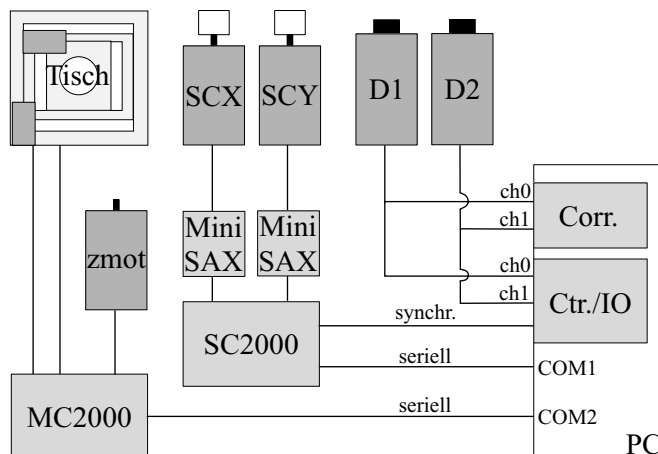


Abbildung 4.7: Schaltschema der Steuer- und Messelektronik für kombinierte FCS- und CLSM-Messungen: Es bedeuten Corr. – Korrelatorkarte, Ctr./IO – Zähler-/Timerkarte, ch0/1 – Kanal 0/1, synchr. – Synchronisationsleitung, COM1/2 – serieller Port 1/2, zmot – Schrittmotor am Fokustrieb. Weitere Erläuterungen im Text.

Verwendung, die Zählraten bis 80 MHz messen und Pulsfolgen ebenfalls bis 80 MHz erzeugen kann. Sie besitzt 8 32-Bit-Zähl- bzw. Timingkanäle sowie bis zu 32 digitale Ein-/Ausgänge, die zum externen Triggern der Zähler oder zur direkten elektronischen Kommunikation mit weiterer Hardware verwendet werden können.

Zur Ansteuerung der Karte stellt der Hersteller Treibersoftware und Bibliotheken u. a. für C/C++ unter dem Namen NI-DAQ bereit. Aus selbst erstellten Programmen heraus kann dann die Karte den Bedürfnissen entsprechend programmiert werden und z. B. aufgenommene Messwerte per DMA (direct memory access) dem Programm zur Weiterverarbeitung übergeben werden.

Für die Laserscanningmikroskopie werden die Signalleitungen der beiden Detektoren mit zwei Zählkanälen verbunden. Die Zählraten werden mit wählbarer Samplingrate aufgenommen, und bei synchronisierter Bewegung der Scanner kann jedes Zählintervall einer Position in der Probe zugeordnet werden. Die Synchronisation geschieht über eine digitale Signalleitung, auf die der Scancontroller (siehe unten) bei Start der Bewegung ein Triggersignal legt. Dieses startet die Messung der Zählraten.

Die Scannertreiber: Um die Galvanometerscanner wohldefiniert zu positionieren oder zu bewegen, ist eine sehr gut stabilisierte Gleichspannung erforderlich, deren Amplitude proportional zum Winkel ist, um den der Scanner aus der Nulllage ausgelenkt ist. Die Treiberboards MiniSAX (*GSI Lumonics*) leisten dies, indem sie die an einen hochohmigen Eingang angelegte Spannung entsprechend umwandeln. Darüberhinaus messen sie kontinuierlich die Position der Spiegel und stellen eine entsprechende Spannung an einem Ausgang zur Verfügung. Auch korrigieren sie gegebenenfalls die möglicherweise mechanisch und thermisch bedingt schwankende Ist- auf die durch die Eingangsspannung definierte Sollposition über einen negativen Rückkopplungsmechanismus.

Der Scancontroller: Die eigentliche Steuerung der Scanner erfolgt über den Mikroprozessor-basierten Scancontroller SC2000 (*GSI Lumonics*), der über eine serielle Schnittstelle (RS232) mit einem Computer verbunden wird und über eine eigene Programmiersprache verfügt. Neben Befehlen zur Kalibrierung und Konfiguration enthält diese Sprache insbesondere Anweisungen zur festen Positionierung und zur kontinuierlichen Bewegung zweier Scanner sowie zur Ausgabe von Synchronisationssignalen. An zwei Ausgängen liegen dann den gewünschten Bewegungen entsprechende Spannungen an, die zwei MiniSAX-Boards zugeführt werden. Eine Synchronisationssignalleitung ist mit der Zählerkarte PCI-6602 verbunden.

Der Schrittmotorcontroller: Die Steuerung der Schrittmotoren des Probentischs und des z -Trieb des Mikroskops erfolgt ebenfalls Mikroprozessor-basiert mit dem Schrittmotorcontroller MC2000 (*Märzhäuser*), der ebenfalls über eine serielle Verbindung (RS232) an den Computer angeschlossen wird und über eine eigene Programmiersprache verfügt. Diese umfasst unter anderem Befehle zur Positionierung und Positionsabfrage.

4.4 Software

4.4.1 Das Mikroskopprogramm FFM

Die Aufnahme konfokaler Bilder sowie orts aufgelöste FCS-Messungen erfordern ein entsprechendes Programm auf dem Steuercomputer (Abb. 4.7), das die Bewegung und Posi-

tionierung der Scanner, die Datennahme durch die Zählerkarte und FCS-Messungen mit der Korrelatorsoftware ALV-5000/E NT kontrolliert. Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit das Programm Fluorescence Fluctuation Microscope (FFM) geschrieben, das mit der Entwicklungsumgebung Visual Studio in Visual C++, einem kommerziellen C++-Compiler von *Microsoft, Unterschleißheim*, nach Gesichtspunkten der Objektorientierung entwickelt wurde. Es kapselt die Kommunikation mit den Hardwarekomponenten und bietet eine graphische Benutzeroberfläche.

Die Funktionalität des Programms ergibt sich aus den Anforderungen an das Fluoreszenzfluktuationsmikroskop, siehe Abschnitt 4.1:

- i) Freie Positionierung des Lasers im Objekt (innerhalb der physikalischen Grenzen) in x -, y - und z -Richtung sowie freie Positionierung des Probenstisches,
- ii) Aufnahme konfokaler Bilder in einem oder zwei Fluoreszenzkanälen, mögliche Kombination mit Durchlichtbildern,
- iii) Auswahl von frei wählbaren Punkten und Linien in der Probe, auf bzw. entlang denen FCS-Messungen durchgeführt werden sollen und
- iv) automatische Messung von Korrelationsfunktionen an definierten Positionen, die manuell gewählt oder aus Bildern übernommen werden.

Positionierung: Die Positionierung erfolgt, indem an den Scan- und an den Schrittmotorcontroller entsprechende Befehle übergeben werden. Anschließend wird die tatsächliche Position abgefragt und angezeigt. Eine gewünschte Position kann mit Sprungbuttons oder durch direkte Eingabe der Koordinaten an der Benutzeroberfläche angewählt werden (Abb. 4.8 b rechts oben). Die Position des Tisches und die z -Position werden außerdem regelmäßig abgefragt, da sie auch mit Hilfe eines an den MC2000 angeschlossenen Joysticks verändert werden können. Die Koordinaten der Schrittmotoren besitzen keinen absoluten Nullpunkt und können daher beliebig gewählt werden, während der Ursprung der Laserposition auf der optischen Achse liegt. Die maximale Auslenkung beträgt $\pm 100 \mu\text{m}$ in x - und y -Richtung. Gleichzeitig kann eine ständige Kontrolle der Zählraten in beiden Signalkanälen aktiviert werden, damit die Detektoren nicht durch zu starke Beleuchtung zerstört werden (Abb. 4.8 b links oben). Ein Ein- und Ausblenden des Lasers erfolgt, indem die Galvanometerspiegel soweit ausgelenkt werden, dass das Laserlicht nicht mehr auf die Scanlinse trifft.

Aufnahme von Bildern: Die erforderlichen geometrischen Parameter zur Aufnahme eines Bildes sind seine Größe, seine Position, der Abstand der Bildpunkte (Pixel) bzw. deren Anzahl und die Verweildauer an einem Punkt (Pixelzeit). Diese können in dem zugehörigen Dialogfeld des Programms eingegeben werden (Abb. 4.8 a rechts und Tab. 4.3). Desweiteren ist auswählbar, ob das Bild in einem oder in beiden Fluoreszenzkanälen gleichzeitig aufgenommen werden soll. Der Scanalgorithmus sieht vor, dass der Bildbereich zeilenweise im Pixelabstand überstrichen wird („on the fly“). Dazu synchronisiert wird die Datennahme der Zählerkarte gestartet, so dass die Kombination aus Fokusgeschwindigkeit in der Probe und Samplingrate Pixelabstand und -zeit wie gewünscht ergibt. Es kann uni- und bidirektional gescannt werden, jedoch birgt der bidirektionale Modus ein Phasenproblem, da für jede Parameterkombination eine spezifische Synchronisation von Hin- und Rückbewegung erforderlich ist. Zeilenweise werden die Zählwerte in den Speicher des Bildes

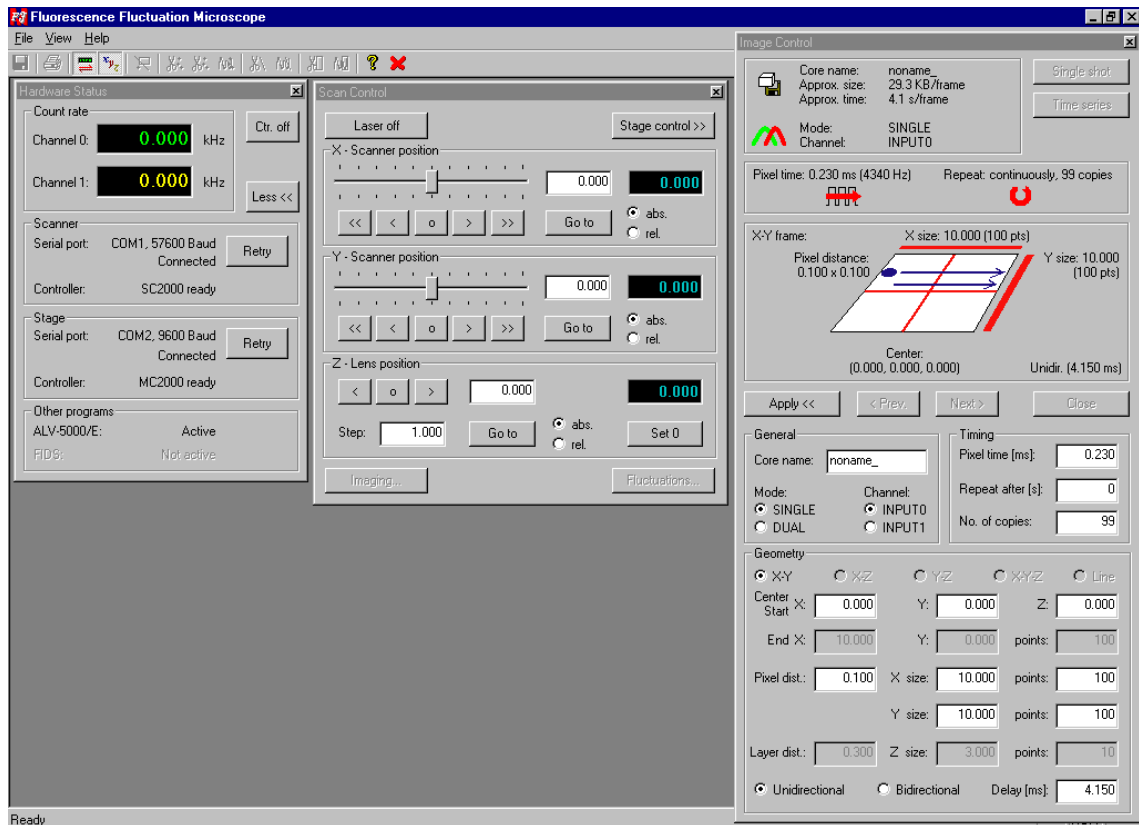
geschrieben und dessen Darstellung aktualisiert. Um ein Durchlichtbild aufzunehmen, ist der Laser z. B. an der Einkopplung in die Faser auszublenden und die Durchlichtlampe des Mikroskops einzuschalten. Solange keine Datennahme erfolgt, wird der Laser aus der Probe ausgeblendet.

Parameter		untere Grenze	obere Grenze
Bildrand	x	$-50\ \mu\text{m}$	$50\ \mu\text{m}$
	y	$-50\ \mu\text{m}$	$50\ \mu\text{m}$
Bildgröße	Maße	$0,33 \times 0,33\ \mu\text{m}^2$	$100 \times 100\ \mu\text{m}^2$
	Pixel	10×10	1000×1000
Pixelabstand	x und y	$0,033\ \mu\text{m}$	$1\ \mu\text{m}$
Pixelzeit	x und y	$0,023\ \text{ms}$	$23\ \text{ms}$

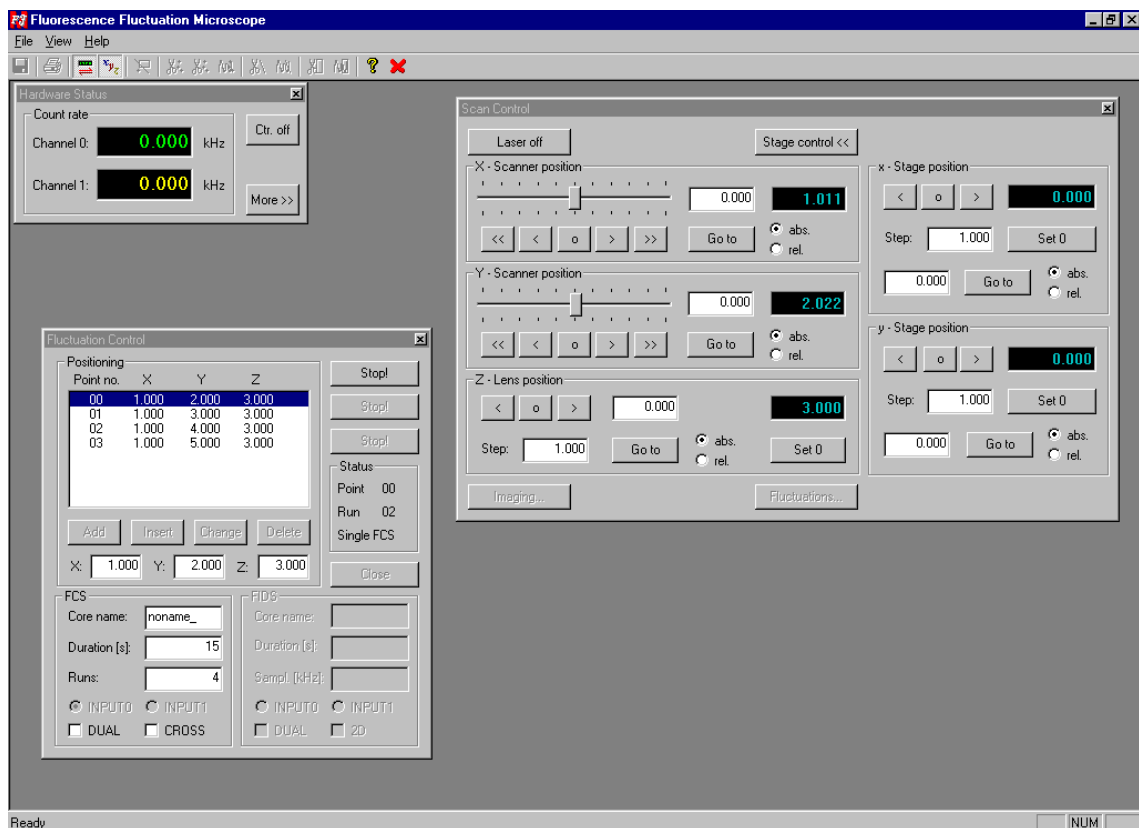
Tabelle 4.3: *Die Grenzen der wählbaren Parameter für die Aufnahme eines Bildes. Weitere Einschränkungen können sich ergeben, da der Scanner eine Mindest- und eine Höchstgeschwindigkeit besitzt.*

Auswahl von Positionen: Die Kombination von CLSM und FCS legt es nahe, in einem aufgenommenen Bild visuell Positionen auswählen zu können, an denen Korrelations- oder andere, methodisch verwandte Messungen durchgeführt werden sollen. Daher können in einem mit dem FFM aufgenommenen Bild Punkte (Kreuze im Bild in Abb. 4.8 c rechts unten) und Linien markiert werden, deren Koordinaten direkt für FCS-Messungen verwendet werden können. Darüberhinaus kann ein rechteckiger Ausschnitt des Bildes als neues Bild definiert und mit eventuell veränderten Parametern aufgenommen werden.

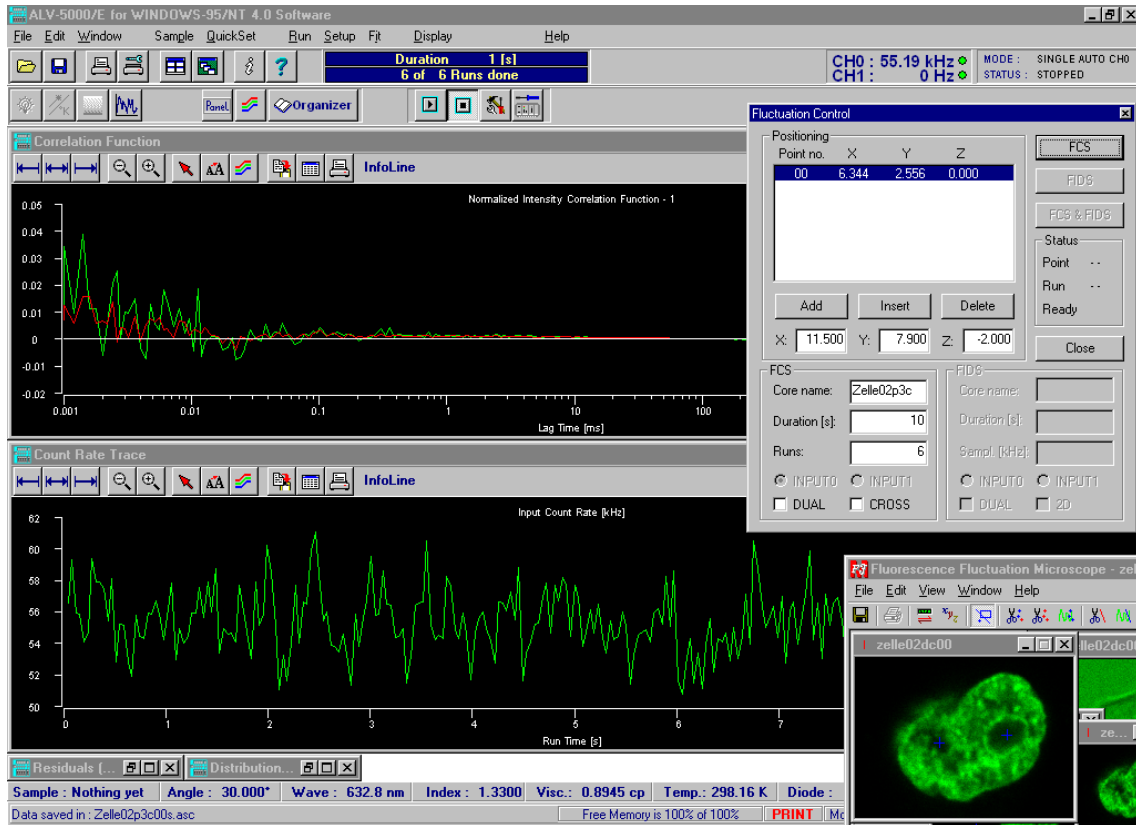
Korrelationsmessungen: Die in einem Bild ausgewählten Positionen können in eine Liste von Punkten übernommen werden, an denen Korrelationsmessungen durchgeführt werden sollen. Diese Liste kann auch von Hand editiert werden (Abb. 4.8 b links unten). Nach Konfiguration der Messungen – Zahl und Dauer der Durchgänge pro Messpunkt, Fluoreszenzkanäle, Auto- oder Kreuzkorrelation – steuert der Laser die Punkte der Liste nacheinander an, und die Korrelatorsoftware wird aktiviert (Abb. 4.8 c). Solange keine Datennahme erfolgt, wird der Laser aus der Probe ausgeblendet.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 4.8: (a) Oberfläche der FFM-Software zur Eingabe der Parameter der Bildaufnahme und (b) zur Eingabe der Parameter von Korrelationsmessungen; (c) Korrelationsmessung mit der Korrelatorsoftware an der mit dem Kreuz im Bild rechts unten markierten Position, angesteuert aus dem FFM-Programm.

4.4.2 Analyse der Korrelationsfunktionen

Zur Analyse der vom Korrelator ausgegebenen Textdateien wurde von Michael Tewes im Rahmen seiner Dissertation das Programm QuickFit [152] entwickelt, das unter Variation der freien Parameter theoretische an gemessene Korrelationsfunktionen anpasst. Dieses Programm ist im Rahmen dieser Arbeit erweitert worden.

Die Modellfunktion berücksichtigt entweder freie dreidimensionale Diffusion von maximal drei nicht wechselwirkenden Spezies in einem homogenen isotropen Medium sowie eine mögliche Besetzung von bis zu zwei nichtstrahlenden Zuständen als Ursache von Fluktuationen, siehe Gl. (3.33), (3.57) und (3.98):

$$G_{\text{theo}} = \frac{1}{N} \left(\frac{1 - \Theta_{\text{non}} + \Theta_{\text{non}} e^{-\tau/\tau_{\text{non}}} - \Theta_{\text{trip}} + \Theta_{\text{trip}} e^{-\tau/\tau_{\text{trip}}}}{1 - \Theta_{\text{non}} - \Theta_{\text{trip}}} \right) \times [(1 - \rho_2 - \rho_3) g_1(\tau) + \rho_2 g_2(\tau) + \rho_3 g_3(\tau)]. \quad (4.3)$$

Dabei sind die $g_s(\tau)$ die Beiträge der einzelnen Spezies

$$g_s(\tau) = \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff},s}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff},s}} \right)^{-1/2}. \quad (4.4)$$

Die 11 Parameter $N^{-1} = (cV_{\text{eff}})^{-1}$, Θ_{non} , τ_{non} , Θ_{trip} , τ_{trip} , ρ_2 , ρ_3 , $\tau_{\text{diff},1}$, $\tau_{\text{diff},2}$, $\tau_{\text{diff},3}$ und κ sind im theoretischen Teil definiert.

Alternativ liegt der Modellfunktion dreidimensionale behinderte Diffusion einer Spezies und eine mögliche Besetzung von bis zu zwei nichtstrahlenden Zuständen zugrunde, siehe Gl. (3.65):

$$G_{\text{theo}} = \frac{1}{N} \left(\frac{1 - \Theta_{\text{non}} + \Theta_{\text{non}} e^{-\tau/\tau_{\text{non}}} - \Theta_{\text{trip}} + \Theta_{\text{trip}} e^{-\tau/\tau_{\text{trip}}}}{1 - \Theta_{\text{non}} - \Theta_{\text{trip}}} \right) \times \left[1 + \left(\frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} \right)^\alpha \right]^{-1} \left[1 + \frac{1}{\kappa^2} \left(\frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} \right)^\alpha \right]^{-1/2} \quad (4.5)$$

mit den 8 Parametern $N^{-1} = (cV_{\text{eff}})^{-1}$, Θ_{non} , τ_{non} , Θ_{trip} , τ_{trip} , τ_{diff} , $\alpha = 2/d_w$ und κ .

Der verwendete Algorithmus der Anpassung, der iterative Marquardt-Levenberg-Algorithmus [119], versucht die Parameter so zu variieren, dass

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{G_{\text{theo}}(\tau_i) - G_{\text{exp}}(\tau_i)}{\sigma_i} \right)^2 \quad (4.6)$$

minimiert wird, i indiziert die diskreten Korrelationszeiten. Es können dabei die Parameter unabhängig voneinander festgehalten werden. Da eine Änderung von χ^2 um deutlich weniger als 1 keine statistische Bedeutung besitzt, wird dies als Abbruchkriterium verwendet. Wenn die Standardabweichungen σ_i zu den einzelnen Korrelationszeiten unabhängig voneinander sind, ergibt dieser Algorithmus den wahrscheinlichsten Parametersatz. Dies ist im Fall der FCS i. a. nicht erfüllt und verfälscht in erster Linie die sich aus den Diagonalelementen der Kovarianzmatrix ergebenden Standardabweichungen der Parameter [119]. Durch mehrere Durchgänge pro Messung und anschließende Mittelung der Korrelationsfunktionen lässt sich jedoch eine annähernde statistische Unabhängigkeit der Einzelwerte der Korrelationsfunktion herstellen. Eine korrekte Bestimmung der σ_i wird in [67, 85] gegeben.

Kapitel 5

Justage und Charakterisierung

5.1 Konfokale Justage

Größe und Form des Fokusvolumens bestimmen entscheidend das Auflösungsvermögen des experimentellen Aufbaus sowohl im FCS- als auch im CLSM-Betrieb. Daher ist eine sorgfältige Justage der optischen Elemente notwendig, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die konfokalen Grundjustagen von FCS-Modul und Scanningeinheit sind unabhängig voneinander, d. h. der Wechsel von kritischen optischen Elementen des FCS-Moduls erfordert eine Grundjustage des Moduls, aber nur eine Überprüfung der Justage der Scanningeinheit. Umgekehrt ist z. B. nach dem Umbau des Experiments von einfachem FCS- zu kombiniertem FCS-/CLSM-Betrieb bei korrekt eingestelltem FCS-Modul nur die Grundjustage der Scanningeinheit durchzuführen. Diese wird im Folgenden dargestellt.

Ausrichten des Strahlengangs durch die Scanningeinheit: Zuerst ist, soweit erforderlich, eine Grund- und Feinjustage des FCS-Moduls durchzuführen. Dazu ist das Modul ohne Scanningeinheit an das Mikroskop zu montieren und wie in [152] beschrieben vorzugehen. Anschließend ist das Modul bei ausgeschalteten Detektoren, aber eingekoppeltem Laserlicht abzuschrauben. Nach Entfernen des Adapters für den Kameraausgang des Mikroskops wird die erste Adapterplatte der Scanningeinheit an das Modul geschraubt und die Descanlinse DL eingesetzt. Nun stellt oder schraubt man das mit zwei Fadenkreuzen im Abstand von ca. 15 cm versehene Hilfsgestell auf die Adapterplatte und verschiebt die Linse DL so, dass das Laserlicht auf der optischen Achse verläuft. Anschließend ist das Hilfsgestell wieder abzunehmen. Dann muss der Kreuztisch KT im Adapterblock mittig eingestellt und der Adapterblock an das Modul geschraubt werden. Der Block aus FCS-Modul und Adapter wird nun an das die Galvanometerscanner aufnehmende Gehäuse montiert. Der Phototubus ist am Kameraausgang des Mikroskops zu befestigen. Die Messinggrundplatte, die jetzt FCS-Modul und Scanningeinheit trägt, kann auf dem optischen Tisch verschoben und mit Hilfe der Zug- und Druckschrauben an den Ecken so in der Höhe verstellt und verkippt werden, dass die fest mit dem Scannergehäuse verbundene Scanlinse SL an den Tubus gefügt werden kann.

Feinjustage: Zur Feinjustage wird das UPlanApo 60×/1.2W-Objektiv in den Strahlengang des Mikroskops gedreht und eine Küvette mit einer Fluorophorlösung in den Probenhalter gesetzt. Die Elektronik für Scanner und Probentisch sowie die Detektoren sind einzuschalten. Nachdem die Mikroskopsoftware gestartet worden ist, befindet sich

der Fokus auf der optischen Achse des Objektivs. Mit der Korrelatorsoftware können die Zählraten verfolgt und durch abwechselndes Verstellen des Achromaten L1 im FCS-Modul und der Descanlinse DL mit den entsprechenden Mikrometerschrauben maximiert werden. Anschließend ist der Fokus in x -Richtung auf $\pm 50 \mu\text{m}$ zu positionieren. Durch Verstellen der horizontalen Kreuzzischraube wird die Zählrate dann in beiden Positionen auf den gleichen Wert gebracht. Dies wird entsprechend in y -Richtung mit der vertikalen Kreuzzischraube durchgeführt. Diese Einstellung von Achromat L1, Descanlinse DL und Kreuzzisch KT ist iterativ auf maximale Zählrate zu optimieren, anschließend wird das FCS-Modul gegen versehentliches Verstellen mit dem Haltewinkel an der Messingplatte fixiert.

Überprüfung der Feinjustage im Messbetrieb: Die Überprüfung der Justage muss nur zu Beginn jeder Messsitzung durchgeführt werden. Sie gestaltet sich einfacher als die oben beschriebene Feinjustage: Die Elektronik für Scanner und Probenstisch sowie der Laser und die Detektoren sind einzuschalten. Die Korrelator- und die Mikroskopsoftware werden gestartet, das UPlanApo $60\times/1.2\text{W}$ -Objektiv in den Strahlengang gedreht und eine Küvette mit einer Fluorophorlösung in den Probenhalter gesetzt. Durch abwechselndes Verstellen des Achromaten L1 und der Descanlinse DL mit den entsprechenden Mikrometerschrauben ist die Zählrate zu maximieren. Abschließend ist das Objektiv an das verwendete Deckglas anzupassen, da Objektive von hoher NA mit deutlicher Zunahme der Fokusgröße auf Schwankungen der Deckglasstärke reagieren. Als praktisch verwendbares Kriterium hat sich ebenfalls die Zählrate herausgestellt, obwohl eine exaktere Kontrolle der Einstellung nur durch Maximierung der Amplitude der Korrelationsfunktion und Minimierung der Diffusionszeit gewährleistet ist [152].

5.2 Charakterisierung

Für quantitative Untersuchungen ist eine genaue Charakterisierung des experimentellen Aufbaus unerlässlich. Zahlreiche Ursachen können zu einer Abweichung von den theoretisch zu erwartenden Eigenschaften führen. Eine ausführliche Beschreibung systematischer Abweichungen durch Variationen bei der konfokalen Justage, des Brechungsindex des Puffers oder der Deckglasstärke ist für das FCS-Modul bereits in [152] vorgenommen worden. Im Folgenden stehen deshalb die Eigenschaften der Abbildung und der Einfluss der Scanningeinheit auf das Fokusvolumen im Vordergrund.

5.2.1 Linearität der Galvanometerscanner

Die Linearität der Abbildung hängt wesentlich vom Verhalten der Galvanometerscanner ab, da eine systematische Abweichung der Ist- von der Sollposition zu Verzerrungen des Bildes führen kann. Die an die Galvanometer angelegte Steuerspannung sollte proportional zum Auslenkwinkel aus der Nullposition sein, damit sich in Kombination mit einem F-Theta-Objektiv die Position linear mit der Steuerspannung ändert.

Im hier verwendeten System ist die Steuerspannung proportional zum Wert, der an den Digital-Analog-Wandler des Scancontrollers übergeben wird. Dieser ist als interne Koordinate zugänglich und liegt in dem Intervall $[-32768, 32767]$. Zur Bestimmung des Auslenkwinkels aus der Nullposition, die dem Wert Null zugeordnet wird, wurde der Laser in das FCS-Modul eingekoppelt und dieses an die Scanningeinheit montiert. Die Scanlinse wurde abgenommen und der Laserstrahl nicht in das Mikroskop, sondern auf einen Wandschirm

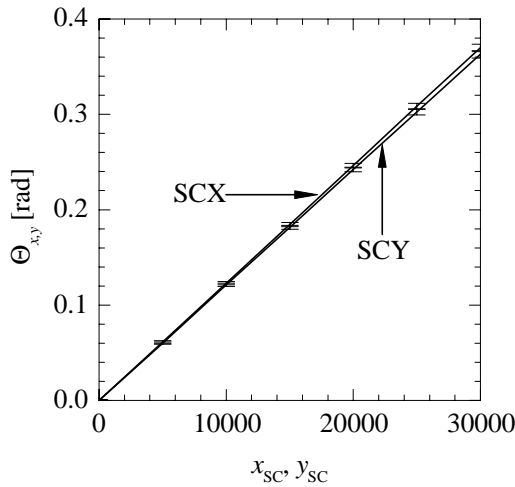


Abbildung 5.1: Die Abhängigkeit der optischen Auslenkung von der Scancontroller-eigenen Koordinate.

gelenkt. Dort konnte dann der optische Auslenkwinkel des Strahls abgelesen werden, der doppelt so groß ist wie der mechanische Auslenkwinkel des Spiegels.

Tab. 5.1 zeigt die Auslenkung des Lasers von der Nullposition als Abstand d_x, d_y auf dem Wandschirm und als Winkel Θ_x, Θ_y für beide Scanner. Letztere sind auch in Abb. 5.1 als Funktion der internen Koordinaten dargestellt und zeigen eine hervorragende Linearität. Da die Spiegel entlang der optischen Achse 23,5 mm voneinander entfernt, die gemessenen Abstände auf dem Wandschirm jedoch nahezu gleich sind, unterscheiden sich die Winkel systematisch um ca. 2 %. Bezogen auf die telezentrische Ebene zwischen den Spiegeln sind die Winkel jedoch identisch. Daher wird zur Umrechnung von Scancontroller-eigenen Koordinaten x_{SC}, y_{SC} in die Position im Objekt im FFM-Programm ein gemeinsamer Umrechnungsfaktor verwendet gemäß

$$x_{Obj} = a x_{SC}, \quad y_{Obj} = a y_{SC} \quad \text{mit}$$

$$a = 0,0111 \pm 8 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}. \quad (5.1)$$

Der Wert ergibt sich gemittelt aus den Anpassungen von Geraden an die Kurven in Abb. 5.1 unter Berücksichtigung der effektiven Brennweite der Scanlinse $f_{SL} = 54 \text{ mm}$ und des Abbildungsmaßstabs des Mikroskops $\beta = 60$. Die Standardabweichung von 0,07 % entspricht etwa der Herstellerangabe (Tab. 4.1) für die Abweichung von der Linearität.

x_{SC}	d_x [cm]	Θ_x [rad]	y_{SC}	d_y [cm]	Θ_y [rad]
0	$0,0 \pm 0,1$	$0,0000 \pm 0,0009$	0	$0,0 \pm 0,1$	$0,0000 \pm 0,0008$
5 000	$7,2 \pm 0,2$	$0,0613 \pm 0,0013$	5 000	$7,2 \pm 0,2$	$0,0600 \pm 0,0012$
10 000	$14,5 \pm 0,2$	$0,1229 \pm 0,0017$	10 000	$14,5 \pm 0,2$	$0,1213 \pm 0,0017$
15 000	$21,9 \pm 0,3$	$0,1844 \pm 0,0021$	15 000	$21,9 \pm 0,3$	$0,1816 \pm 0,0020$
20 000	$29,5 \pm 0,3$	$0,2462 \pm 0,0025$	20 000	$29,5 \pm 0,3$	$0,2422 \pm 0,0024$
25 000	$37,4 \pm 0,4$	$0,3084 \pm 0,0032$	25 000	$37,4 \pm 0,4$	$0,3026 \pm 0,0031$
30 000	$45,5 \pm 0,5$	$0,3697 \pm 0,0039$	30 000	$45,5 \pm 0,5$	$0,3630 \pm 0,0038$

Tabelle 5.1: Die Abhängigkeit der optischen Auslenkung der Scanner von der Scancontroller-eigenen Koordinate. Die Entfernung der jeweiligen Drehachse betrug $117,4 \pm 0,5 \text{ cm}$ (SCX) bzw. $119,8 \pm 0,5 \text{ cm}$ (SCY).

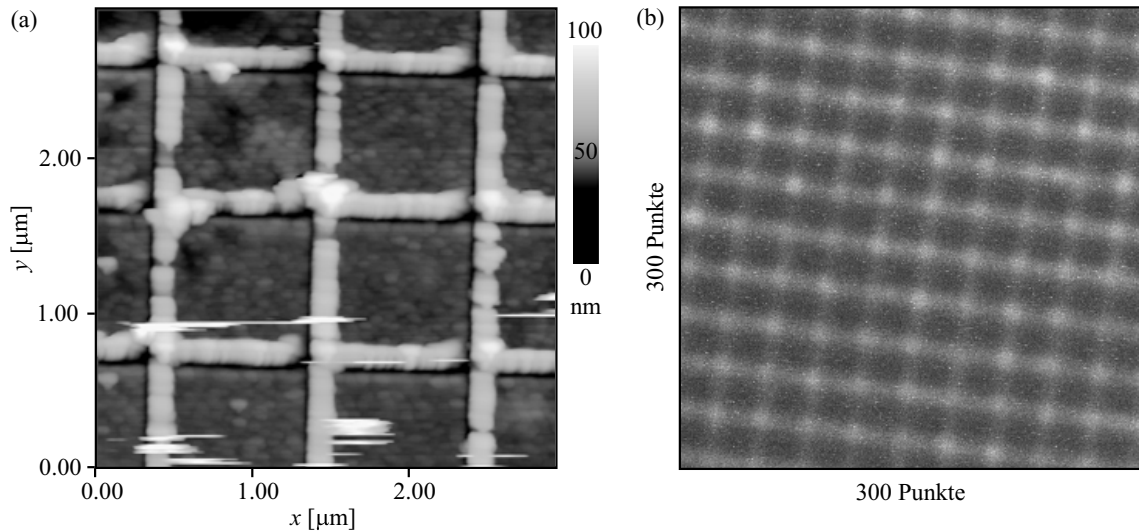


Abbildung 5.2: (a) Rasterkraftmikroskopisches Bild der Referenzprobe, die Höheninformation ist Grauwert-codiert. (b) Fluoreszenzmikroskopisches Bild der Referenzprobe (Fluoreszenzsignal als kontrastgebende Größe).

5.2.2 Abbildungsmaßstab

Die im vorhergehenden Abschnitt angegebene Umrechnung von Scancontroller- in physikalische Objektkoordinaten wurde im FFM-Programm implementiert. Als Referenzprobe zur Bestimmung des tatsächlichen Abbildungsmaßstabs des gesamten Systems ist ein auf einer Glasoberfläche aufgebrachtes Goldgitter von *Digital Instruments, Mannheim*, verwendet worden. Dieses kommt auch als Referenzprobe in der Rasterkraftmikroskopie zur Verwendung. Die kraftmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts zeigt Abb. 5.2 a (N. Mücke, Abt. Biophysik der Makromoleküle, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Der Abstand der Gitterstreben beträgt $1,00 \pm 0,01$ μm.

Diese Probe wurde mit einer Fluorophorlösung benetzt (Alexa488 von *Molecular Probes*, 9 nM) und auf ein Deckglas gelegt. Die Fokalebene des Objektivs wurde direkt oberhalb des Deckglases positioniert. Ein 300×300 Punkte großes Fluoreszenzbild (Kanal 0) mit einem nach Gl. (5.1) berechneten Pixelabstand von 33,3 nm wurde aufgenommen (Abb. 5.2 b). Gemittelt über zahlreiche Gitterstreben ergibt sich mit der bekannten Gittergröße ein Pixelabstand von $32,9 \pm 1,7$ nm, der berechnete Abbildungsmaßstab des gesamten Systems stimmt also innerhalb der Messgenauigkeit mit dem experimentell bestimmten überein.

5.2.3 Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Positionierung

Insbesondere orts aufgelöste FCS-Messungen erfordern eine hohe räumliche Stabilität des Fokus an einer angewählten Position. Vor allem Eigenschaften der Galvanometerscanner wie Jitter, Wobble, thermische Drift und Abweichung von der Linearität beeinflussen dies.

Um diesen Effekt quantifizieren zu können, wurde der Laser auf einen definierten Punkt gestellt und wiederholt die Position abgefragt, die die scannereigenen kapazitiven Sensoren zurückgeben. Es ergibt sich eine Gaußverteilung mit einer Standardabweichung von 21 nm, deren Maximum um $-2,6$ nm aus der Sollposition verschoben ist (Abb. 5.3). Anschließend wurde der Fokus wiederholt um 10 nm verschoben, wieder zurückgesetzt und die Position

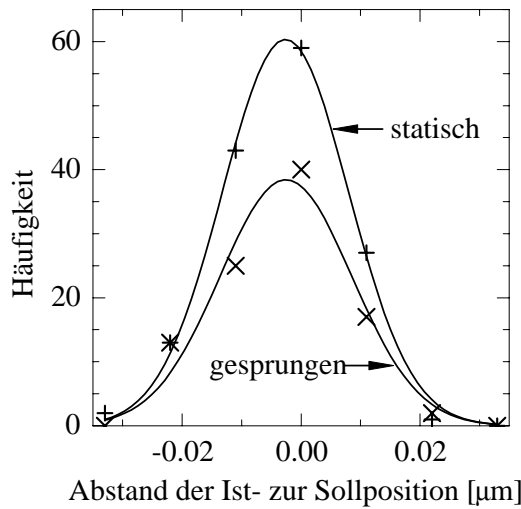


Abbildung 5.3: Die Genauigkeit und Stabilität der Positionierung des Fokus in der Probe, gemessen mit den scannereigenen kapazitiven Sensoren. Die Stabilität des Fokus bei einer Position (statisch) und die angefahrte Position nach einem Sprung um $10\text{ }\mu\text{m}$ (gesprungen) über zahlreiche aufeinanderfolgende Messungen zeigen Offset und Gauß'sche Verbreiterung.

gemessen. Auch jetzt ist die gemessene Position Gauß-verteilt mit einer Standardabweichung von 22 nm und einem Offset von $-2,6\text{ nm}$ (Abb. 5.3). Der Offset variiert von Messsituation zu Messsituation um bis zu $\pm 5\text{ nm}$ und entsteht durch den Kalibrierungsalgorithmus beim Programmstart.

Eine Standardabweichung von 22 nm gehört zu einer optischen Winkelungenauigkeit von $24\text{ }\mu\text{rad}$. Dies entspricht den Herstellerangaben von $12\text{ }\mu\text{rad}$ (mechanisch, Tab. 4.1), die Positionierengenauigkeit geht also in erster Linie auf die Scanner zurück.

5.2.4 Auflösung und Transmissionsprofil

Um den Einfluss des Scanners auf das transmittierte Licht und das Fokusvolumen zu bestimmen, wurde das FCS-Modul ohne Scanningeinheit an das Mikroskop angeschlossen und die Justage überprüft. An eine Autokorrelationsmessung einer Alexa488-Lösung (9 nM) bei einer Zählrate von $76,6 \pm 4,2\text{ kHz}$ konnte die Modellfunktion, Gl. (4.3), mit einer Spezies der Diffusionszeit $42,6 \pm 0,9\text{ }\mu\text{s}$ und einem Strukturfaktor von $4,2$ angepasst werden. Anschließend wurde die Scanningeinheit eingefügt, die gesamte Justage durchgeführt und bei gleicher Laserleistung in der gleichen Probe erneut eine Autokorrelationsfunktion aufgenommen. Die Zählrate betrug jetzt $49,3 \pm 2,9\text{ kHz}$ und die Diffusionszeit bei gleichem Strukturfaktor $35,6 \pm 0,9\text{ }\mu\text{s}$. Durch die Scanningeinheit verringert sich also das Fluoreszenzsignal um etwa ein Drittel, und das Auflösungsvermögen wird nicht verschlechtert.

Abb. 5.4 zeigt die Autokorrelation einer Alexa488-Lösung (20 nM), gemessen mit der Scanningeinheit auf der optischen Achse mit den Objektkoordinaten $(0; 0)$. Es kann die Modellfunktion mit einer Spezies und einem Tripletzustand angepasst werden kann. Die systematische Abweichung im Bereich um $0,1\text{--}1\text{ ms}$ ist bereits in FCS-Messungen ohne die Scanningeinheit beobachtet worden [152] und kann mit einer zweiten Komponente mit einem Anteil von ca. 2% und einer Diffusionszeit um $0,3\text{ ms}$ beschrieben werden. Sie ist wahrscheinlich auf Abweichungen des Fokusvolumens von der dreidimensionalen Gauß-funktion zurückzuführen [125] (Abb. 3.2). Gemittelt aus mehreren Messungen ergeben sich eine Diffusionszeit $\tau_{\text{diff}} = 35,6 \pm 0,6\text{ }\mu\text{s}$ und ein Strukturfaktor $\kappa = 4,17 \pm 0,14$. Aus vergleichenden FCS-Messungen von Fluorescein und Alexa488 sowie dem Diffusionskoeffizienten von Fluorescein in Wasser $D_0 = (2,60 \pm 0,26) \cdot 10^{-10}\text{ m}^2/\text{s}$ [149] ergibt sich ein Diffusionskoeffizient von Alexa488 in Wasser $D_0 = (2,09 \pm 0,21) \cdot 10^{-10}\text{ m}^2/\text{s}$. Mit Gl. (3.14) und (3.33) können dann der laterale und der axiale Radius sowie das Volumen des Fokus berechnet

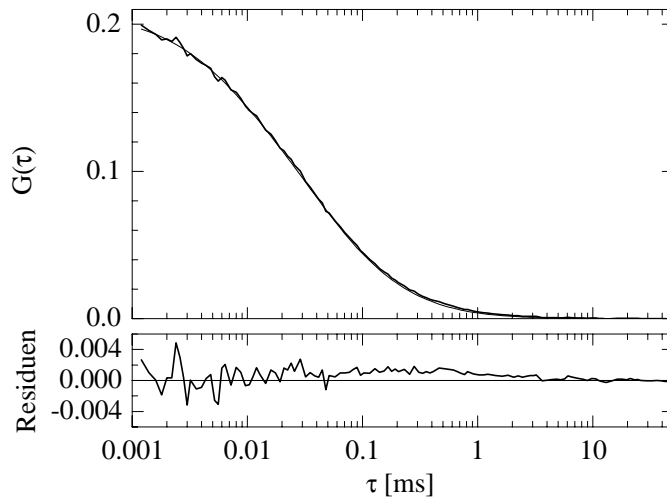


Abbildung 5.4: Autokorrelation einer Alexa488-Probe, gemessen auf der optischen Achse (dick) und die angepasste Modellfunktion (dünn) sowie die zugehörigen Residuen (unten). Aus der Anpassung ergeben sich folgende Parameter:

$$\begin{aligned}\Theta_{trip} &= 0,13 \pm 0,02, \\ \tau_{trip} &= 5 \pm 2 \mu s, \\ N &= 4,8 \pm 0,1, \\ \tau_{diff} &= 35 \pm 2 \mu s, \\ \kappa &= 4,3.\end{aligned}$$

und mit den theoretisch erwarteten Werten aus Gl. (3.12) und (3.14) verglichen werden (Tab. 5.2). Danach ist der Fokus experimentell bestimmt etwas größer als mit dem Ansatz der korrigierten Überbeleuchtung vorhergesagt. Die theoretischen Werte liegen allerdings innerhalb der jeweiligen Standardabweichung, und das gemessene Achsenverhältnis bzw. der Strukturfaktor stimmt mit der Vorhersage überein.

Größe	in	experimentell	theoretisch
$w_0 = 2\sqrt{D_0\tau_{diff}}$	nm	172 ± 10	164
$z_0 = \kappa w_0$	nm	717 ± 47	685
$V_{focus} = \frac{4}{3}\pi w_0^2 z_0$	al	89 ± 12	77

Tabelle 5.2: Experimentell bestimmte und theoretisch erwartete geometrische Parameter des Fokusvolumens.

Die Scanningeinheit erlaubt die Positionierung des Fokus im Objekt auch außerhalb der optischen Achse. Da die Scanlinse nicht in telezentrischer Geometrie zu verwenden ist und auch moderne Mikroskope nicht frei von optischen Fehlern der Komponenten und Abweichungen vom idealen Strahlengang sind, kann die Auslenkung des Fokus aus der optischen Achse die Größe des Fokus beeinflussen und zu weiteren Verlusten des detektierten Fluoreszenzsignals führen. Die Abhängigkeit des lateralen Fokusradius von der Position in der Probe $10 \mu m$ über dem Deckglas zeigt Abb. 5.5 a: An den dargestellten Positionen wurde die Korrelation der Alexa488-Probe gemessen und mit einer Komponente und einem Strukturfaktor von 4,2 angepasst. Daraus konnte w_0 berechnet werden. Die Standardabweichung jeder Messung beträgt 10 nm , so dass über einen großen Bereich die Schwankungen diese Grenze nicht überschreiten. Allerdings zeigt das Profil einen signifikant asymmetrischen Verlauf in x -Richtung, was auf die bezüglich einer Auslenkung in x unsymmetrische Lage des Strahlteilers im Mikroskop zurückgeführt werden kann (Abb. 4.1).

Abb. 5.5 b stellt das zugehörige Fluoreszenzsignal dar: Es ist ein deutlicher radialsymmetrischer Abfall zu erkennen, jedoch fällt das Signal innerhalb eines Radius von ca. $35 \mu m$ nicht unter 80 % des Maximums von etwa 95.

Positioniert man den Laser an verschiedenen Punkten auf der optischen Achse und wiederholt die FCS-Messungen, so zeigt sich nur sehr nahe am Deckglas ein Effekt (Abb. 5.6):

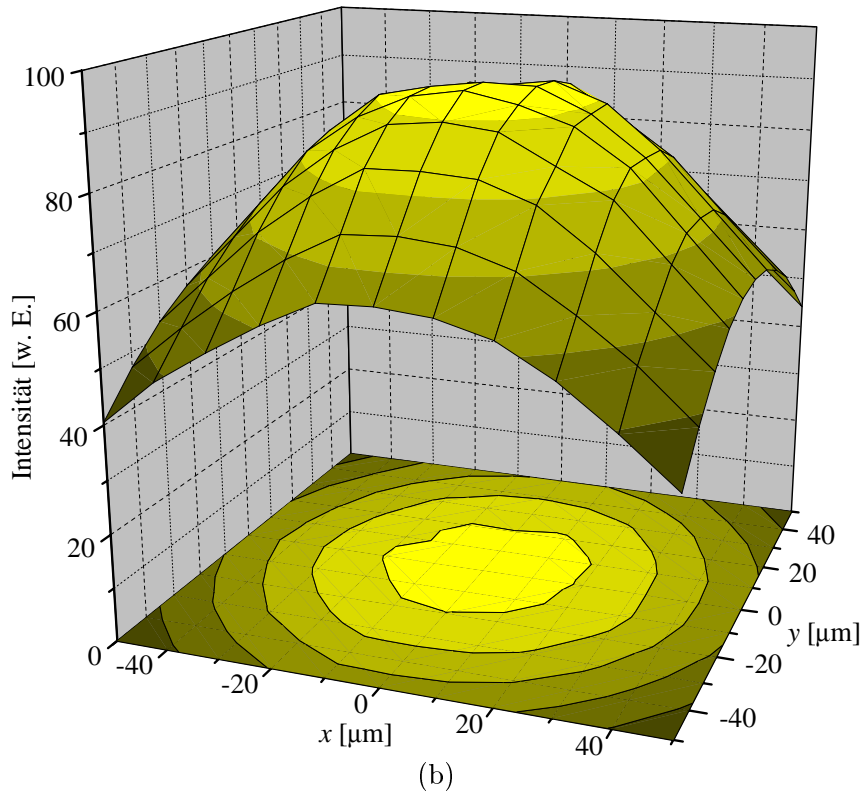
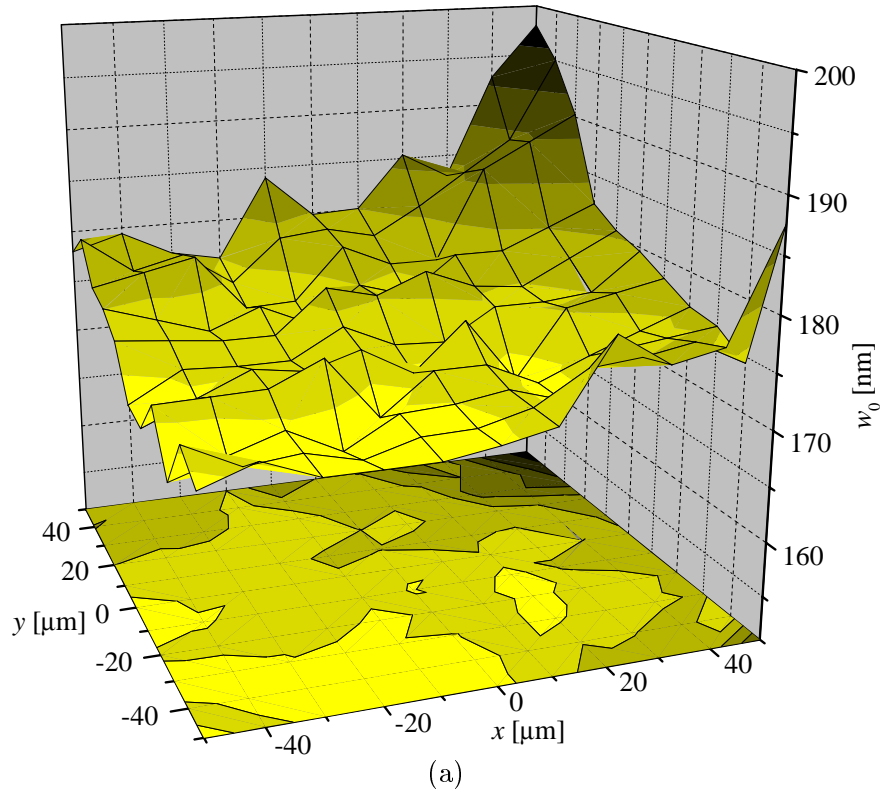


Abbildung 5.5: *Laterales Profil (a) der Fokusgröße und (b) des Fluoreszenzsignals, bestimmt mit orts aufgelösten Autokorrelationsmessungen in einer Alexa488-Probe 10 μm über dem Deckglas.*

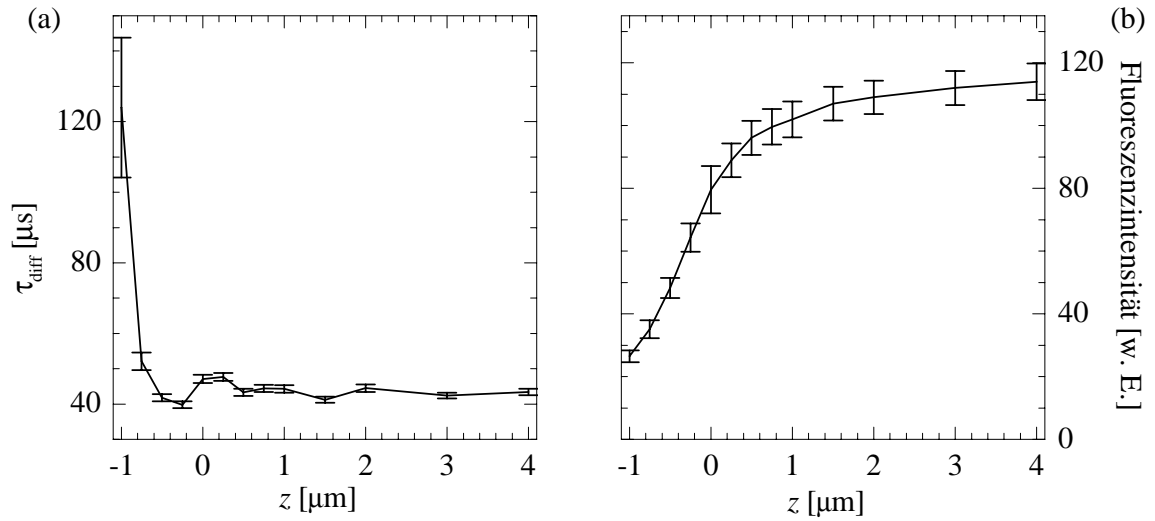


Abbildung 5.6: Axiales Profil von (a) Diffusionszeit und (b) Fluoreszenzsignal, bestimmt mit orts aufgelösten Autokorrelationsmessungen in einer Alexa488-Probe auf der optischen Achse. Die Null entspricht der Position des Deckglases, die allerdings nur auf etwa $0,5 \mu\text{m}$ genau bestimmt werden konnte.

Die Diffusionszeit steigt an, und das Fluoreszenzsignal fällt ab. Insbesondere der nur geringe Einfluss auf die Diffusionszeit erlaubt FCS-Messungen in adherent wachsenden Zellen nahe der Glasoberfläche.

Damit erweist sich FCS als geeignete Methode, das Fokusbild zu vermessen bzw. den Verlauf der Detektionswahrscheinlichkeit zu bestimmen. Dies ist insbesondere nützlich für die Anwendung von Dekonvolutionsverfahren auf konfokale Bilder.

Kapitel 6

Intrazelluläre Diffusionsmessungen

Die Experimente zur Beweglichkeit konzentrieren sich auf den Einfluss, den intrazelluläre Strukturen auf die Mobilität von inerten Molekülen verschiedener Größe besitzen. Die ausführlicheren Untersuchungen an EGFP- und EGFP- β -Galactosidase-exprimierenden und an mit Alexa568 inkubierten Zellen wurden vor der Fertigstellung der Scanningeinheit mit dem Schrittmotor-getriebenen Probenstisch durchgeführt. Die Mobilität der Dextrane und des DsRed konnten bereits mit kombinierter konfokaler Mikroskopie und ortsauflöser FCS untersucht werden und erfordern noch weitere Experimente. Daran schlossen sich erste Experimente mit einem funktionellen Protein an: Am Beispiel des Transkriptionsterminationsfaktors TTF-I wurde Bindung und Beweglichkeit *in vivo* untersucht.

6.1 Beweglichkeit inerter Moleküle im Zellkern

Um den Einfluss der dreidimensionalen Struktur in der Zelle und insbesondere des Chromatins im Zellkern auf die Beweglichkeit von Molekülen verschiedener Größen untersuchen zu können, benötigt man inerte Moleküle, die keinerlei Bindungen eingehen. Darüberhinaus sollten sie keine toxische Wirkung zeigen und so in die Zellen eingebracht werden können, dass deren Lebensfähigkeit möglichst wenig beeinflusst wird. In diesen Experimenten wurden entweder Zelllinien verwendet, die autofluoreszente Proteine exprimieren, oder es wurden synthetische Moleküle durch möglichst schonende Inkubation oder Mikroinjektion in die Zellen gebracht.

6.1.1 EGFP und EGFP- β -Galactosidase in COS-7- und AT-1-Zellen

Material und Methoden

AT-1 ist eine etablierte Zelllinie, die einem Prostatakarzinom von Ratten entstammt, und COS-7-Zellen sind auf SV40-transformierte Affennierenzellen zurückzuführen. Zellen beider Linien wurden von G. Müller und W. Waldeck (Abt. Biophysik der Makromoleküle, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) mit Vektoren entweder für EGFP (27 kDa, *Clontech, Heidelberg*) oder für das EGFP- β -Galactosidase-Fusionsprotein (EGFP- β -gal, 81 kDa, Abb. 6.1) durch Fusion der Zellmembran mit Liposomen (Lipofectamin) transfiguriert. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37° C in phenolrotfreiem RPMI-Medium (*Life Technologies, Karlsruhe*) mit 10 % fötalem Kälberserum. Vor FCS-Messungen wurden die Zellen in mit Kunststoffkammern beklebten Deckgläsern

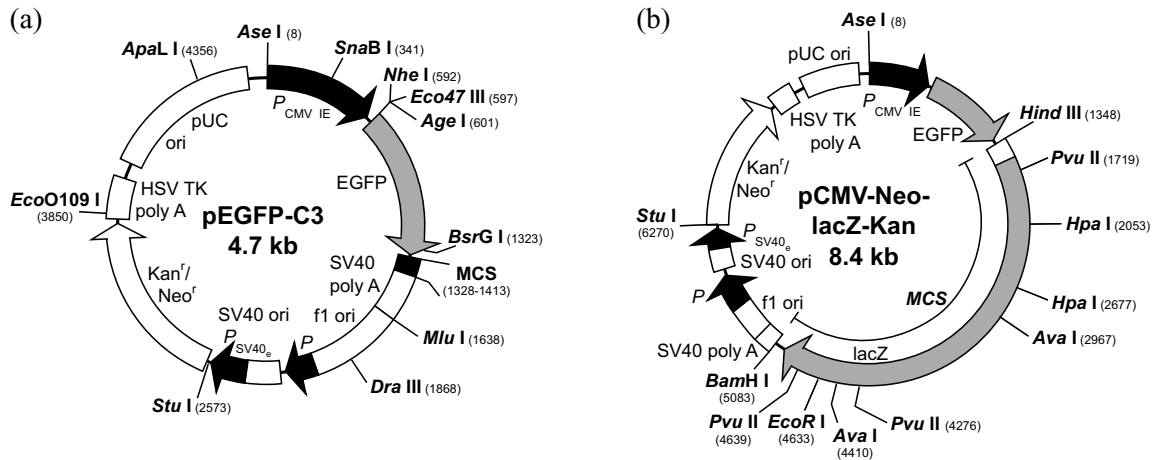


Abbildung 6.1: Plasmidkarten der Expressionsvektoren: (a) EGFP-C3-Plasmid, (b) EGFP- β -Galactosidase-Plasmid, abgeleitet von dem Vektor pCH110 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Das β -gal-Gen wurde an den Restriktionsschnittstellen HindIII und BamHI ausgeschnitten und in die Multiple Cloning Site (MCS) von (a) eingefügt.

ausgesät (Chambered Coverslides, Nunc, Darmstadt) und für mindestens weitere 24 Stunden inkubiert. Für die Messungen wurden diese Deckgläser bei Raumtemperatur auf dem Probentisch befestigt. Nichttransfizierte Kontrollzellen (AT-1, COS-7) wurden genauso behandelt.

Für spektroskopische und FCS-Messungen von EGFP in Lösung wuchsen EGFP-exprimierende sowie nichttransfizierte AT-1-Zellen in Petrischalen von 145 mm Durchmesser bis zur Konfluenz. Anschließend wurden sie zweimal mit eiskaltem hypotonischem Tris-Puffer gewaschen (20 mM Tris-HCl, pH 7,5) und quollen für 5 min auf Eis. Nach Entfernen des Puffers wurden die Zellen zusammengeschaßt und ihre Hüllen mechanisch mit einem Dounce-Homogenizer Typ S zerstört. Pro Schale wurde das Volumen mit isotonischem Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, pH 7,5) auf 2,5 ml ergänzt. Die lysierten Zellen wurden 5 min bei 10 000 U/min zentrifugiert und der Überstand in isotonischem Tris-Puffer mit pH-Werten zwischen 5,5 und 9,5 1:10 und 1:100 verdünnt. Dieses Vorgehen gewährleistete, dass der Zellkern, andere größere Organellen und große Makromoleküle entfernt wurden und nur noch Moleküle mit zum EGFP vergleichbarem Molekulargewicht in wässriger Lösung vorlagen.

Alle Fluoreszenzspektren wurden mit einem SLM-Aminco-8100-Spektrofluorimeter (SLM Instruments, Urbana, IL/USA) mit Doppelmonochromatoren für Anregung und Detektion durchgeführt.

Die FCS-Messungen dieses Abschnitts wurden in dem beschriebenen Aufbau ohne Scanningeinheit vorgenommen. Neben dem Objektiv UPlanApo 60 \times /1.2W kam auch das Modell UPlanFl 20 \times /0.5W mit einer NA von 0,5 und 20facher Vergrößerung zur Verwendung. Nach Fertigstellung der Scanningeinheit wurde ein Teil der Experimente damit wiederholt.

Charakterisierung von zellulärem EGFP

Über das Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektrum hinaus kann EGFP mit der deutlichen pH-Abhängigkeit seiner Fluoreszenzausbeute, mit den zwei zusätzlichen exponentiellen Abfällen in Korrelationsmessungen infolge zweier konkurrierender Protonierungspro-

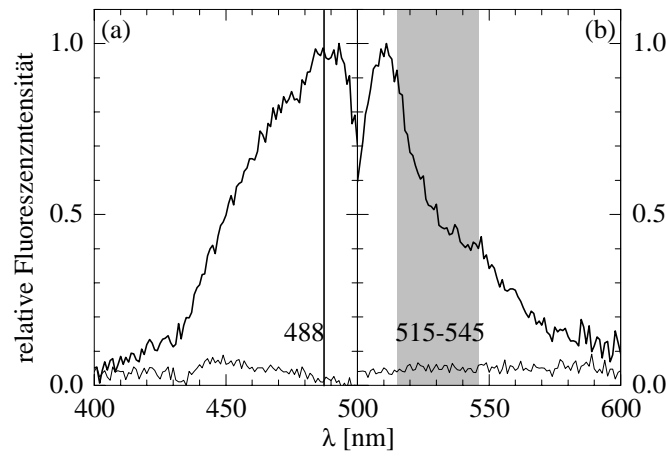


Abbildung 6.2: (a) Anregungsspektren bei Detektion mit 510 nm und (b) Emissionsspektren bei Anregung mit 488 nm der Zellextrakte von EGFP-exprimierenden Zellen (dick) und nichttransfizierten Zellen (dünn). Der vertikale Strich markiert die Anregungswellenlänge des Lasers und das grau hinterlegte Intervall das Transmissionsspektrum des Detektionskanals 0 im FCS-Experiment.

zesse (Abschnitt 3.4.1) und mit seinem Diffusionskoeffizienten charakterisiert werden. Um zu überprüfen, ob die Fluoreszenz in EGFP-exprimierenden Zellen auch EGFP zugeordnet werden kann, wurden diese Eigenschaften in den oben beschriebenen Zellextrakten untersucht.

Abb. 6.2 stellt die Anregungs- und Emissionsspektren der Fluoreszenz von Extrakten transfizierter und nichttransfizierter Zellen bei pH 7,5 dar. In guter Übereinstimmung mit veröffentlichten Ergebnissen (Abb. 2.6 und 2.8) zeigt die Anregung der EGFP enthaltenden Lösung einen kontinuierlichen Anstieg bis zu einem Maximum bei ca. 490 nm. Die Emission fällt nach einem Peak bei etwa 510 nm mit einer Schulter um 540 nm zu großen Wellenlängen ab. Der Verlauf der Spektren ist unabhängig vom pH. Im Vergleich dazu weist die Fluoreszenz aus nichttransfizierten Zellen keine deutlichen Maxima sowie eine wesentlich kleinere Ausbeute auf, insbesondere beträgt das über das Detektionsspektrum des FCS-Experiments integrierte Signal weniger als 10 % von dem EGFP-exprimierenden Zellen.

Die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute aus verschiedenen FCS-Messungen (Abb. 6.3) kann mit Gl. (3.99) angepasst werden. Man erhält für den Parameter pK_a $6,0 \pm 0,4$, was auch in anderen Arbeiten für EGFP gefunden wurde [54, 98, 105] und für den angenommenen einstufigen Protonierungsprozess spricht (Abschnitt 2.2.2 und 3.4.1).

Die Anpassung von Korrelationsmessungen, die in den EGFP-Extrakten mit dem Objektiv UPlanFl 20 \times /0.5W ausgeführt wurden, erfordert zwei nichtstrahlende Komponenten

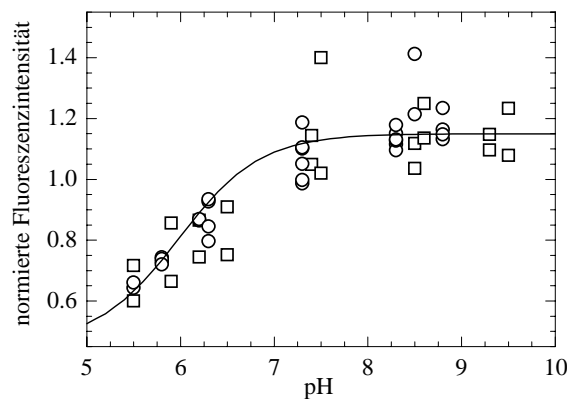


Abbildung 6.3: pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute der Extrakte aus EGFP-exprimierenden Zellen: Messungen in isotonischem (o) und hypotonischem Puffer (\square) und die angepasste Modellfunktion (durchgezogen).

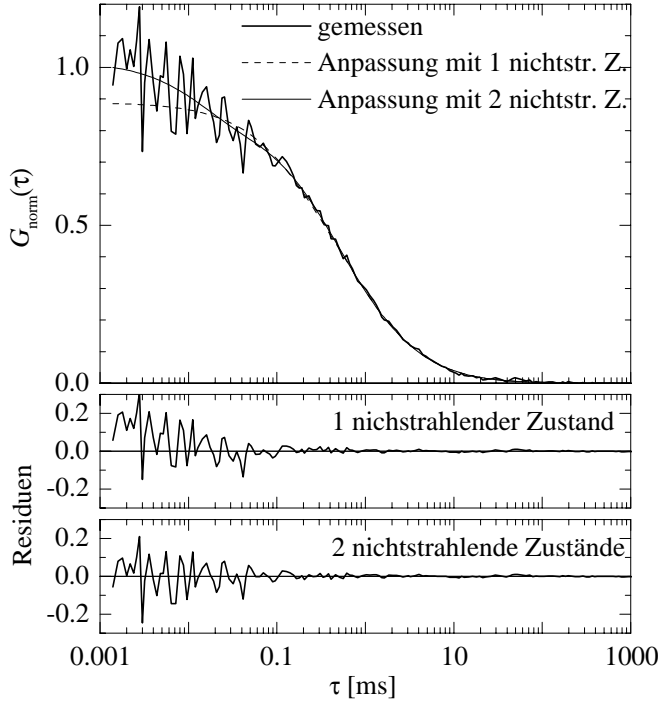


Abbildung 6.4: *Normierte Autokorrelation von EGFP in Lösung mit pH 7,4: Die an die gemessene Kurve angepassten Modellfunktionen mit den zugehörigen Residuen zeigen, dass die beste Anpassung mit zwei nichtstrahlenden Zuständen erreicht wird.*

in der Modellfunktion, wie Abb. (6.4) zeigt. Da zu erwarten ist, dass der intrazelluläre pH-Wert zwischen 7 und 8 liegt [34], können die Parameter der exponentiellen Zerfälle in der Modellfunktion Gl. (3.98) aus verschiedenen FCS-Messungen mit pH-Werten zwischen 6,2 und 8,6 gemittelt werden. Damit ergeben sich

$$\begin{aligned}
 \Theta_1 &= 0,16 \pm 0,01, \\
 \tau_1 &= 9 \pm 1 \mu\text{s}, \\
 \Theta_2 &= 0,14 \pm 0,03, \\
 \tau_2 &= 310 \pm 20 \mu\text{s}.
 \end{aligned} \tag{6.1}$$

Die Diffusionszeit von $\tau_{\text{diff}} = 810 \pm 90 \mu\text{s}$ ist also deutlich größer als die exponentiellen Zerfallszeiten, was für die Ableitung der Modellfunktion vorausgesetzt wurde. Diese Werte wurden auch für die Anpassung intrazellulärer FCS-Messungen verwendet. Mit Gl. (3.97) können daraus die Geschwindigkeitskonstanten der in Abb. 3.11 skizzierten Prozesse abgeleitet werden:

$$\begin{aligned}
 k_{\text{prot},i} &\simeq 1,4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}, \\
 k_{\text{deprot},i} &\simeq 9,3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}, \\
 k_{\text{prot},e} &\simeq 9,8 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}, \\
 k_{\text{deprot},e} &\simeq 6,4 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}.
 \end{aligned} \tag{6.2}$$

Aus weiteren Korrelationsmessungen konnte eine Diffusionszeit von $144 \pm 10 \mu\text{s}$ ermittelt werden, die zusammen mit der gemessenen Diffusionszeit und dem aus [149] bekannten Diffusionskoeffizienten von Fluorescein einen Diffusionskoeffizienten von $8,7 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ für EGFP wie erwartet ergibt [151, 150].

Die in den Extrakten aus EGFP-exprimierenden AT-1-Zellen gefundene Fluoreszenz kann also EGFP zugeordnet werden.

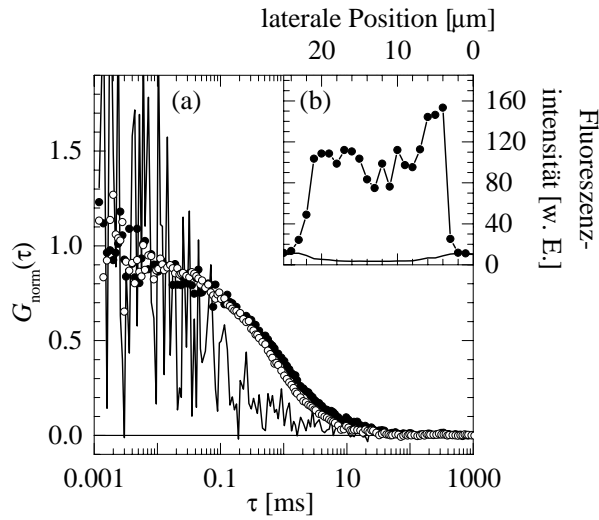


Abbildung 6.5: (a) Normierte Autokorrelationen von EGFP *in vivo* an Pos. 1 in Abb. 6.6 im Zytoplasma (\circ) und an Pos. 2 im Kern (\bullet) in einer EGFP-exprimierenden AT-1-Zelle sowie im Kern einer nichttransfizierten Zelle (—). (b) Intensitäts-Linescans durch eine EGFP-exprimierende ($-\bullet-$) und durch eine nichttransfizierte Zelle (—).

FCS-Linescans in Zellen

Zur Charakterisierung der zellulären Autofluoreszenz wurden in nichttransfizierten Zellen FCS-Linescans durchgeführt, d. h. FCS-Messungen an äquidistanten Punkten entlang einer Linie. Abb. 6.5 b zeigt den Intensitätsverlauf durch eine EGFP-exprimierende und durch eine nichttransfizierte AT-1-Zelle, normiert auf das Signal im Medium: In der nichttransfizierten Zelle ist das Signal zwei- bis dreimal kleiner als im Medium, während die Fluoreszenz in der transfizierten Zelle auf mehr als das 40fache ansteigt. Dies ist auch in COS-7-Zellen zu beobachten. Ebenso sind Autokorrelationsfunktionen aus nichttransfizierten Zellen sehr viel verrauschter (Abb. 6.5 a) und zeigen oft keine Korrelation, was auf einen großen immobilisierten Anteil deutet (Abschnitt 3.2.6). Für alle damit konformen Verhältnisse von korreliertem zu unkorreliertem Signal sind die Konzentrationen der Teilchen, die die zelluläre Autofluoreszenz tragen, von gleicher Größenordnung wie die EGFP-Konzentration. Die Helligkeitsunterschiede sind darum in erster Linie auf unterschiedliche Quantenausbeuten zurückzuführen, und wie in Abschnitt 3.2.7 gezeigt, kann man bei Verhältnissen der Quantenausbeuten von >40 die dunklere Komponente in FCS-Experimenten nicht mehr beobachten. Deshalb kann die zelluläre Autofluoreszenz in EGFP- und EGFP- β -gal-exprimierenden Zellen vernachlässigt werden.

Bei den dann durchgeführten FCS-Linescans durch fluoreszente Zellen war eine Orientierung in der Zelle in konventioneller Durchlichtmikroskopie mit gleichzeitig eingekoppeltem Laser möglich, der als blauer Lichtpunkt zu erkennen war. Die sichtbaren Kompartimente und ihre Grenzen konnten so identifiziert und in den Abb. 6.6–6.9 mit den Buchstaben „c“ für das Zytoplasma, „n“ für den Kern und „m“ für Plasmamembranen markiert werden. Es wurden zu Beginn jeder Messung Eichmessungen mit Alexa488 oder Fluorescein in Lösung durchgeführt, um absolute Diffusionskoeffizienten berechnen zu können. Soweit erkennbar, wurde vornehmlich in Interphasezellen gemessen.

Es konnte insgesamt Diffusion beobachtet werden, die im Kern sehr viel deutlicher als im Zytoplasma von idealer Brown'scher Bewegung abwich. Die Viskosität war im Rahmen der Messgenauigkeit überall gleich. Ein Beispiel für den Unterschied im Diffusionsverhalten zeigt Abb. 6.5 a: Die Korrelationsfunktion von Pos. 1 im Zytoplasma (markiert in Abb. 6.6) kann als einzelne, frei diffundierende Komponente mit zwei nichtstrahlenden Zuständen angepasst werden (Diffusionskoeffizient $D = 12,5 \pm 1,3 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). Die Korrelationsfunktion von

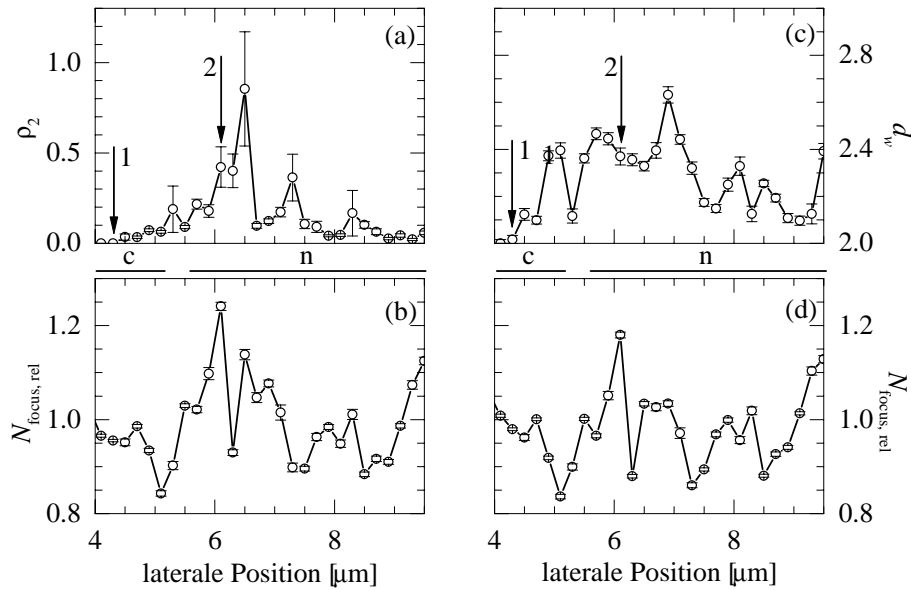


Abbildung 6.6: FCS-Scan durch eine EGFP-exprimierende AT-1-Zelle: (a) Anteil der langsamen Komponente und (b) relative Teilchenzahl im Zwei-Komponenten-Modell, (c) Anomalieparameter und (d) relative Teilchenzahl im Modell der behinderten Diffusion als Funktion der Position in der Zelle.

Pos. 2 im Kern erfordert jedoch entweder eine zweite Komponente ($D_1 = 9,8 \pm 1,6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, $D_2 = 1,0 \pm 0,6 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) oder behinderte Diffusion zur Anpassung ($D_1 = 8,7 \pm 1,0 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, $d_w = 2,3 \pm 0,1$). Der kleine, aber quantifizierbare Unterschied zwischen den beiden Korrelationsfunktionen in Abb. 6.5 zeigt den in Abschnitt 3.3.1 theoretisch vorhergesagten langsameren Abfall und ist gut vergleichbar mit Abb. 3.6.

Um die räumliche Abhängigkeit des Diffusionsverhaltens zu veranschaulichen, sind in Abb. 6.6 die Parameter der Anpassung der Korrelationsfunktionen gegen die Position aufgetragen. Sie beruhen auf FCS-Messungen in einer EGFP-exprimierenden AT-1-Zelle. In der Interpretation als Zwei-Komponenten-System kann überall in der Zelle eine schnelle Spezies gefunden werden. Die Anpassungen werden dann mit dem Mittelwert $\langle \tau_{\text{diff},1} \rangle$ dieser Spezies fortgesetzt. Die zusätzliche langsame Komponente tritt mit einem ortsabhängigen Anteil ρ_2 vor allem im Kern auf, dabei zeigen die Diffusionszeiten $\tau_{\text{diff},2}$ eine breite Verteilung zwischen 10 und 100 ms. Trotz der geringen Laserintensität, die $1,32 \text{ kW/cm}^2$ nicht überschritt, kam es durch Photobleaching zu einer langsamen, näherungsweise exponentiellen Abnahme der Konzentration fluoreszenter Teilchen. Die in der Abbildung angegebene relative Teilchenzahl im Fokus $N_{\text{foc,rel}}$ wird daher berechnet, indem der Anpassungsparameter N aus Gl. (4.3) bzw. (4.5) durch einen exponentiellen Abfall mit einer Zeitkonstante von 30–90 min geteilt wird. In jeder einzelnen Korrelationsmessung fallen Konzentration und Rate also so langsam ab, dass der Effekt vernachlässigbar ist (Gl. (3.48)). Die durchschnittliche Konzentration von EGFP-Monomeren und Fusionsproteinen lag in diesen Experimenten zwischen 10 und 150 nM. Die Teilchenzahl $N_{\text{foc,rel}}$ zeigt Schwankungen, die bis zu $\pm 20\%$ ausmachen und sich in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen als Intensitätsschwankungen manifestieren würden. Interpretiert man die Korrelationen im Modell der behinderten Diffusion, so weicht der Anomalieparameter d_w vor allem im Kern deutlich von zwei ab, während der räumliche Verlauf ähnliche Strukturen wie ρ_2 aufweist.

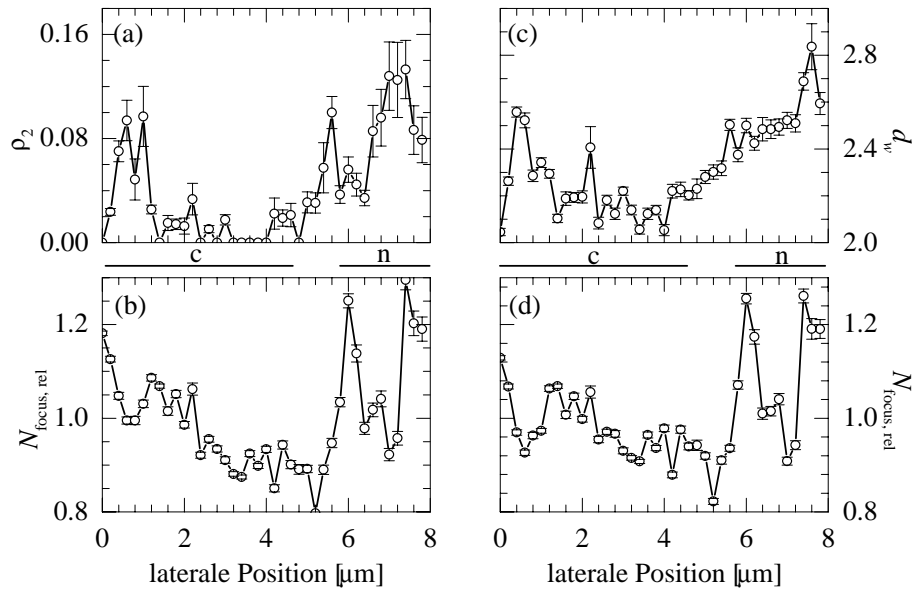


Abbildung 6.7: FCS-Scan durch eine EGFP-exprimierende COS-7-Zelle: (a) Anteil der langsamen Komponente und (b) relative Teilchenzahl im Zwei-Komponenten-Modell, (c) Anomalieparameter und (d) relative Teilchenzahl im Modell der behinderten Diffusion als Funktion der Position in der Zelle.

In EGFP-exprimierenden COS-7-Zellen konnte qualitativ das gleiche Verhalten beobachtet werden (Abb. 6.7): Die Abweichung von freier Diffusion einer Spezies fällt besonders im Kern auf, entweder in Form eines Behinderungsparameters $d_w > 2$ oder als Anteil einer langsamen Komponente $\rho_2 > 0$. Ähnlich wie in AT-1-Zellen zeigen die räumliche Abhängigkeit von d_w und ρ_2 deutliche und ähnliche Strukturen. Auch im Zytoplasma können Bereiche mit Abweichungen von freier Diffusion beobachtet werden, da natürlich auch hier zelluläre Strukturen die Beweglichkeit behindern.

Einen FCS-Scan durch eine AT-1-Zelle, die die EGFP- β -Galactosidase-Chimäre exprimiert, zeigt Abb. 6.8. Wiederum ist mit beiden Interpretationsmöglichkeiten eine deutliche Abweichung der Beweglichkeit von idealer freier Diffusion zu beobachten, und Zellmembran, ein zytoplasmatischer und ein nuklearer Bereich können unterschieden werden. Bei diesem Beispiel kommt es auch außerhalb des Kerns zu deutlicher Behinderung. Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde der Scan entlang der gleichen Linie, aber über eine längere Strecke durch die ganze Zelle wiederholt. Die in den d_w - und ρ_2 -Profilen vorhandenen Strukturen konnten qualitativ wiedergefunden werden. Allerdings kam es zu einer globalen räumlichen Verschiebung um 1–2 μm und zu leichten internen Veränderungen, die der Wiederholungenauigkeit der Positionierung des Probenstriches sowie globalen und internen zellulären Bewegungen zugeordnet werden konnten. Eine noch deutlichere Unterscheidung zwischen Zytoplasma und Kern in Form variierender Diffusionseigenschaften zeigt der FCS-Scan durch eine EGFP- β -gal-exprimierende COS-7-Zelle in Abb. 6.9.

Es konnten in beiden Linien und mit beiden Proteinen Zellen gefunden werden, in denen die Moleküle sowohl im als auch außerhalb des Kerns das gleiche Diffusionsverhalten ohne größere Bereiche der Behinderung aufwiesen. Diese Zellen befinden sich vermutlich in einer anderen Zellzyklusphase mit stärker kondensiertem Chromatin.

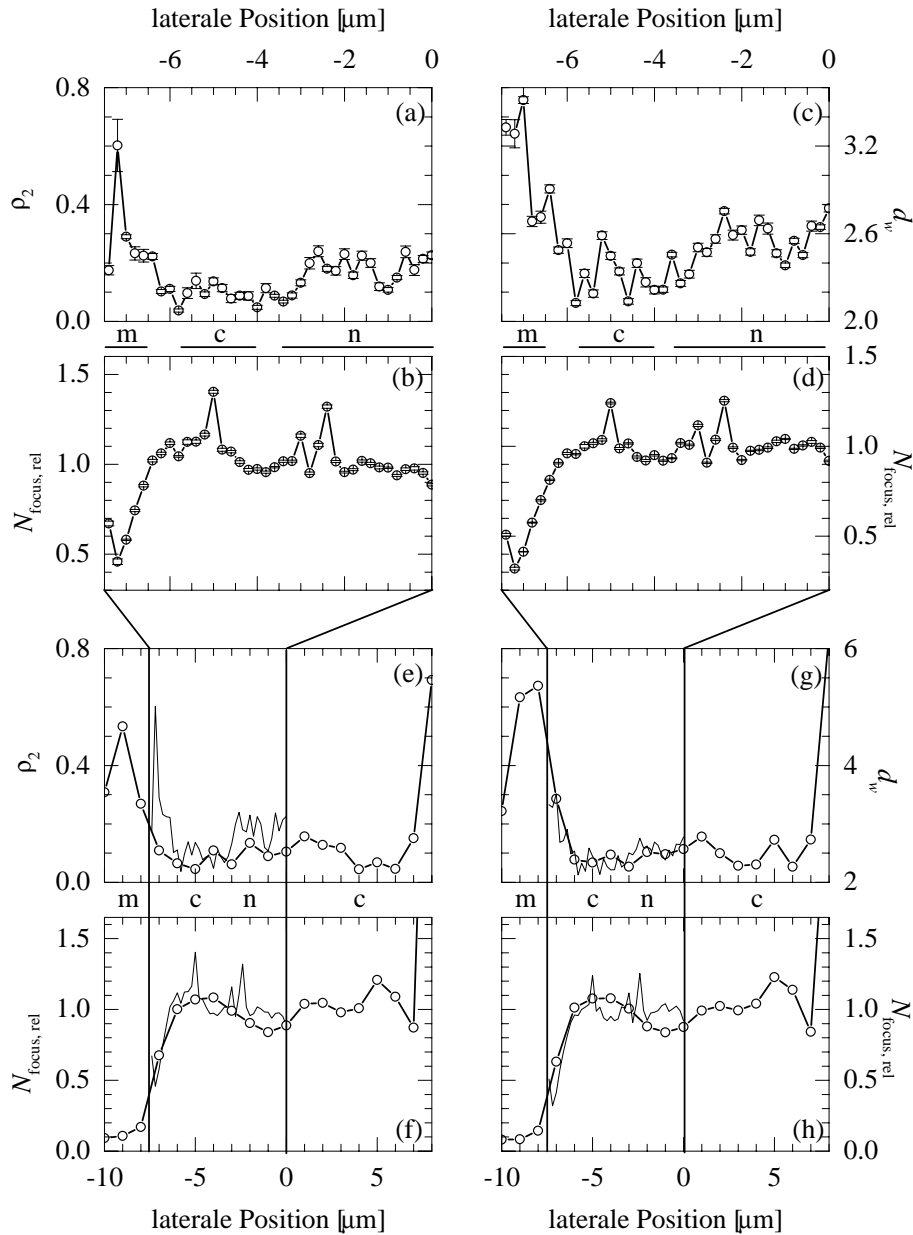


Abbildung 6.8: FCS-Scan durch eine EGFP- β -gal-exprimierende AT-1-Zelle: (a) Anteil der langsamen Komponente und (b) relative Teilchenzahl im Zwei-Komponenten-Modell, (c) Anomalieparameter und (d) relative Teilchenzahl im Modell der behinderten Diffusion als Funktion der Position in der Zelle. (e-h) Ergebnisse der Wiederholung des FCS-Scans entlang der gleichen Linie, jetzt durch die gesamte Zelle ($-\circ-$), verglichen mit dem Scan aus (a-d) ($-$).

Darüberhinaus wurden Zellen verworfen, in denen es während der FCS-Messungen zu wahrnehmbaren Schwankungen des Fluoreszenzsignals im Sekundenbereich kam. Diese können internen und globalen zellulären Bewegungen zugeordnet werden und führen zu unzuverlässigen Ortsinformationen.

Beide Interpretationsmöglichkeiten der Daten erlauben eine Aussage über den Diffusionskoeffizienten, den das Molekül in freier Lösung mit der gleichen Viskosität wie im

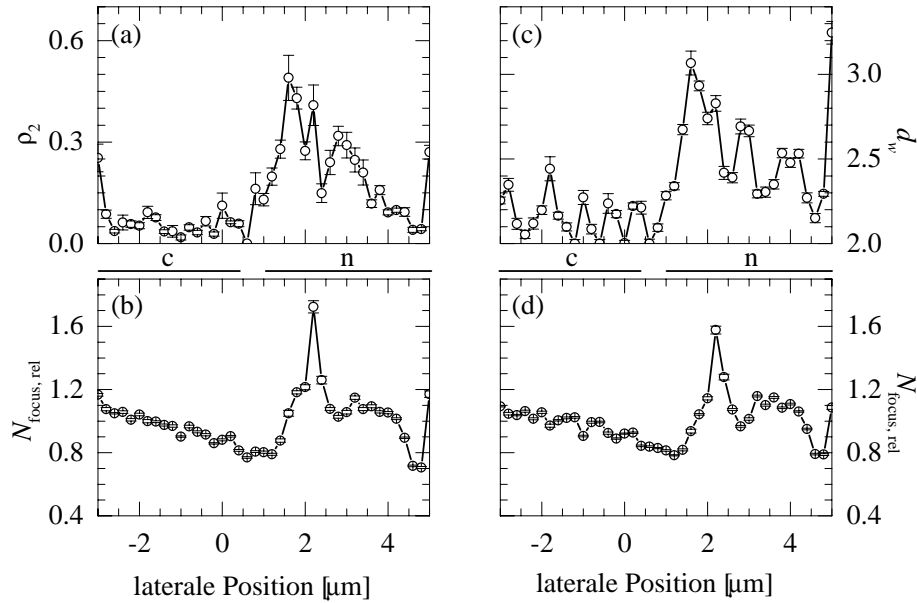


Abbildung 6.9: FCS-Scan durch eine EGFP- β -gal-exprimierende COS-7-Zelle: (a) Anteil der langsamen Komponente und (b) relative Teilchenzahl im Zwei-Komponenten-Modell, (c) Anomalieparameter und (d) relative Teilchenzahl im Modell der behinderten Diffusion als Funktion der Position in der Zelle.

Zytosol hätte. Aus dem Vergleich der Diffusionszeiten bzw. -koeffizienten von EGFP in wässriger Lösung mit den intrazellulären Werten kann daher eine zytosolische Viskosität angegeben werden, die etwa 5fach höher als in Wasser ist (Tab. 6.1). Zur Berechnung der Werte sind die intrazellulären Diffusionszeiten über zahlreiche Positionen in mehreren Zellen gemittelt worden. Das Verhältnis der Diffusionszeiten bzw. -koeffizienten von EGFP und dem Fusionsprotein beträgt ca. 1,4, entsprechend dem Massenverhältnis von 3, das bei globulären Proteinen zu einem Verhältnis der Diffusionskoeffizienten von $\sqrt[3]{3} \approx 1,4$ führt.

		zwei Komponenten	behinderte Diffusion	Zellen
AT-1	$D_{\text{mono,aq}}/D_{\text{mono,cell}}$	$5,3 \pm 0,6$	$5,5 \pm 0,6$	9
	$D_{\text{mono,cell}}/D_{\text{fusion,cell}}$	$1,4 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,4$	6
COS-7	$D_{\text{momo,aq}}/D_{\text{mono,cell}}$	$4,7 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,7$	8
	$D_{\text{momo,cell}}/D_{\text{fusion,cell}}$	$1,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,3$	4

Tabelle 6.1: Verhältnis der Diffusionskoeffizienten von EGFP (mono) in vivo (cell) und in wässriger Lösung (aq) sowie das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten von EGFP und EGFP- β -gal (fusion). Die Referenz ist der Diffusionskoeffizient von EGFP in wässriger Lösung $D = 8,7 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

FCS-Linescans von EGFP-exprimierenden AT-1- und COS-7-Zellen wurden mit der Scanningeinheit wiederholt. Dazu wurden konfokale Fluoreszenzbilder der Zellen aufgenommen und die Linien für die Linescans im Bild ausgewählt. Nach den FCS-Messungen wurde erneut ein Bild erstellt, um den Verlust an Fluoreszenzintensität sichtbar zu machen und eventuelle Bewegungen der Zelle zu erkennen. Sowohl die ermittelten intrazellulären Viskositäten als auch die typischen Werte des Anomalieparameters konnten quantitativ

bestätigt werden. Die Orientierung in den Zellen erwies sich als sehr viel einfacher.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen zusammen mit einer zunehmenden Anzahl weiterer Arbeiten [11, 17, 118, 138], dass FCS eine geeignete Methode zur Untersuchung der Beweglichkeit inerter Moleküle in lebenden Zellen ist.

Um sicherzustellen, dass die intrazelluläre Fluoreszenz von EGFP emittiert worden ist, sind die Fluoreszenzspektren, deren pH-Abhängigkeit und intramolekulare Fluktuationen untersucht und quantitativ beschrieben worden. Die Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit veröffentlichten Untersuchungen [151, 24, 149, 16, 150, 54, 98, 154] und erlauben darüberhinaus eine Aussage über die Kinetik molekularer Konformationen.

Untersuchungen zur intrazellulären Viskosität [61, 79, 77, 78, 149, 150, 141, 104] zeigen, dass diese 2,6- bis 10fach größer als in Wasser ist. Dies ist mit den FCS-Messungen mit beiden Interpretationsmöglichkeiten bestätigt worden, insbesondere hat sich herausgestellt, dass im Zellkern die Viskosität für Proteine von durchschnittlicher Größe ca. 4- bis 6fach größer ist [141, 118] und nicht signifikant von den zyotosolischen Werten abweicht. Da typische eukaryotische Zellen ca. 70 % (w/w) Wasser enthalten [34], kann ein Bild entwickelt werden, nach dem ein großer Anteil des Kernvolumens ein dem Zytosol ähnliches Nukleosol enthält. Darin befinden sich Makromoleküle und größere Komplexe in einer flüssigen Phase. Sie alle tragen in verschiedenem Maße zur Viskosität bei, je nach Größe der Moleküle, deren Beweglichkeit untersucht wird [61].

Der verbleibende Raum ist mit Chromatin, assoziierten Molekülen und Einschlusskörpern (Speckles, Nukleoli etc.) erfüllt, die nahezu immobile Hindernisse dar- und mögliche Bindungsstellen bereitstellen. Die Interpretation der FCS-Messungen im Zwei-Komponenten-Modell erfordert eine sehr inhomogene Verteilung und hohe Konzentration dieser Hindernisse, um die Entstehung von Fallen etc. zu ermöglichen (Abschnitt 3.3.3). Im Modell der behinderten Diffusion hingegen (Abschnitt 3.3.1) ist bereits mit relativ homogen verteilten Hindernissen geringerer Dichte eine deutliche Abweichung von freier Diffusion zu erwarten. Außerdem erfasst es den Einfluss von strenger organisierten Strukturen wie Grenzflächen, Kanälen und Fallen zumindest qualitativ. Der Anomalieparameter d_w kann in einen theoretischen Bezug zu Größen wie der fraktalen Dimension der behindernden Strukturen gebracht werden [20], die aus strukturellen Untersuchungen oder Polymermodellen des Zellkerns gewonnen werden können (Abschnitt 2.1.2). Daher erscheint das Modell der anomalen Diffusion als die geeignetere Interpretation der FCS-Messungen. In Systemen mit mehreren realen Komponenten *und* behinderter Diffusion [97, 118] ist eventuell eine gleichzeitige Beobachtung der interessierenden Spezies und inerter Testmoleküle erforderlich.

Die erwartete Abhängigkeit der Diffusionseigenschaften von der Größe der Moleküle, ihr Zusammenhang mit der Chromatinstruktur sowie der Einfluss von unspezifischen und spezifischen Bindungen sollten in weiteren Experimenten genauer untersucht werden. Die Kombination der FCS mit CLSM vereinfacht eine Orientierung in der Zelle und ermöglicht erst die gleichzeitige Charakterisierung von Diffusion und dreidimensionaler Organisation.

6.1.2 Dextrane in HeLa-Zellen

Vermutlich hängt die Behinderung der Diffusion durch die dreidimensionale Struktur des Zellkerns, wie sie im vorhergehenden Abschnitt beobachtet wurde, deutlich von der Teilchengröße ab. Synthetische Moleküle wie Dextrane lassen sich einfach in definierten Größen z. B. durch Mikroinjektion in Zellen einbringen, um die Beweglichkeit zu untersuchen. Mit anderen Methoden wie FRAP ist dies schon durchgeführt worden [80], jedoch besteht bei FRAP die Gefahr, behinderte Diffusion als größeren immobilisierten Anteil und langsamere freie Diffusion zu interpretieren [93, 104]. Darüberhinaus wurde beobachtet, dass sich kleine Dextranmoleküle sehr homogen im Zellkern verteilen, große hingegen deutliche Konzentrationsschwankungen zeigen, die mit der Dichteverteilung von Chromatin in Bezug gesetzt werden können (P. Verschure, Swammerdam Institute for Life Sciences, Amsterdam, Niederlande, pers. Mitteilung). Die folgenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit P. Verschure durchgeführt.

Material und Methoden

HeLa ist eine Zelllinie, die einem humanen Cervixkarzinom entstammt. HeLa-Zellen wurden in Kammerdeckgläsern unter den gleichen Bedingungen wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben für mindestens 24 Stunden kultiviert. Dextrane sind hydrophile Polysaccharide, die sich durch sehr gute Wasserlöslichkeit, geringe Toxizität und gute Resistenz gegen Abbau durch zelleigende Glycosidasen auszeichnen. Von mit dem Farbstoff Alexa568 markierten Dextranmolekülen (*Molecular Probes*) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10 und 70 kDa wurden jeweils Stammlösungen von ca. 40 μM angelegt. Verdünnungen von etwa 1:10 wurden bei 14 000 U/min für 10–15 min zentrifugiert und der Überstand anschließend in Kerne von HeLa-Zellen mikroinjiziert. Die Mikroinjektion wurde von R. Fischer (Abt. Biomedizinische Strukturanalyse, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) mit dem halbautomatischen System AIS der Firma *Zeiss* durchgeführt. Das injizierte Volumen betrug dabei typischerweise 5 % des Kernvolumens. Ein solches Vorgehen gewährleistet eine hohe Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen (P. Verschure, pers. Mitteilung). Die Zellen wurden noch einmal eine Stunde lang in den Kammerdeckgläsern inkubiert, bevor diese zu mikroskopischen Aufnahmen und FCS-Messungen bei Raumtemperatur auf dem Probenstisch befestigt wurden. Zur Kontrolle wurden auch nichtinjizierte Zellen verwendet.

Die Bilder und FCS-Messungen dieses Abschnitts wurden in dem beschriebenen Aufbau mit der Scanningeinheit und dem Objektiv UPlanApo 60 \times /1.2W aufgenommen.

Dextrane in Lösung

Zur Charakterisierung der hydrodynamischen Eigenschaften wurde die Diffusion der fluoreszenzmarkierten Dextrane in wässriger Lösung untersucht. Mit FCS-Messungen einer Eichlösung von Alexa488 und von 1:10 000-Verdünnungen der Dextran Stammlösungen konnten deren Konzentrationen auf $\sim 40 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Mit Kenntnis des Diffusionskoeffizienten von Alexa488, $D = 2,1 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, können die Diffusionskoeffizienten und hydrodynamischen Radien der Dextrane aus den Diffusionszeiten durch den Fokus berechnet werden:

$$\begin{aligned} D_{10} &= (8,5 \pm 1,1) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}, \\ R_{h,10} &= 2,6 \pm 0,3 \text{ nm}, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 D_{70} &= (2,70 \pm 0,35) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}, \\
 R_{h,70} &= 8,1 \pm 1,0 \text{ nm}.
 \end{aligned}
 \tag{6.3}$$

Die Abhängigkeit der Radien von der Masse ergibt damit ungefähr $R_h \propto m^{1/2}$. Ein solches Verhalten ist einer elongierten, nicht-sphärischen Form zuzuschreiben. Der Diffusionskoeffizient der 10 kDa-Dextrane in wässriger Lösung ist dem von EGFP sehr ähnlich und erlaubt einen Vergleich des Diffusionsverhaltens *in vivo*.

FCS-Linescans in Zellen

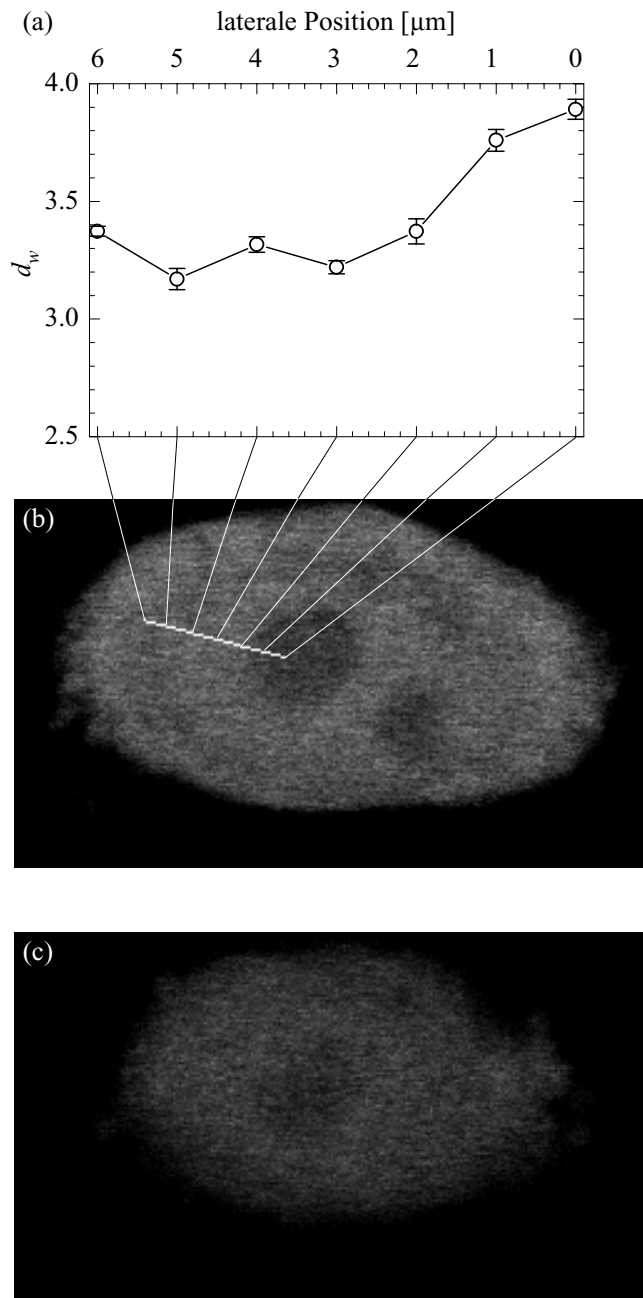


Abbildung 6.10: FCS-Scan durch einen 10 kDa-Dextrane enthaltenden HeLa-Kern: (a) Anomalieparameter d_w als Funktion der Position in der Zelle, (b) konfokales Fluoreszenzbild (256×148 Punkte, Pixelabstand 100 nm) mit den Positionen für FCS-Messungen vor und (c) nach dem FCS-Scan.

Ähnlich wie bei den Messungen der Beweglichkeit von EGFP und EGFP- β -gal konnte auch in nichtinjizierten HeLa-Zellen mit analogem Vorgehen gezeigt werden, dass die zelluläre Autofluoreszenz gegenüber der Fluoreszenz der markierten Dextrane vernachlässigt werden kann. Von fluoreszenten Zellen in der Interphase wurde ein konfokales Fluoreszenzbild erstellt, dabei stellte sich heraus, dass die Fluoreszenz nahezu ausschließlich im Kern lokalisiert war. Es wurden Linien für FCS-Messungen ausgewählt, die möglichst von einem Nukleolus bis zur Kernmembran verlaufen sollten. Nach den FCS-Messungen wurde erneut ein Fluoreszenzbild aufgenommen, um den Verlust an Fluoreszenzintensität sichtbar zu machen und eventuelle Bewegungen der Zelle zu erkennen.

Es konnte insgesamt keine Immobilisierung der Dextrane beobachtet werden, die gemäß Gl. (3.115) zu einem Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität führen würde. Die Moleküle zeigten überall im Kern behinderte Diffusion mit einem mittleren Anomalieparameter $d_w > 3$, also größer als für EGFP und EGFP- β -gal (Abb. 6.6–6.9 und Tab. 6.2). Zwischen den 10 kDa- und den 70 kDa-Molekülen war im Rahmen der Messgenauigkeit und bei der kleinen Zahl untersuchter Zellen kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die Viskosität des Nukleosols ist für Moleküle dieser Größe etwa viermal größer als Wasser.

Dextrane	relative Viskosität	Anomalieparameter	Zellen
10 kDa	$3,5 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$	3
70 kDa	$4,2 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,2$	3

Tabelle 6.2: *In vivo*-Viskositäten und -Anomalieparameter von 10 kDa- und 70 kDa-Dextranen.

Um die räumliche Abhängigkeit des Diffusionsverhaltens zu veranschaulichen, ist in Abb. 6.10 a der Anomalieparameter aus der Anpassung der Korrelationsfunktionen an das Modell der behinderten Diffusion gegen die Position in einem 10 kDa-Dextrane enthaltenen Zellkern aufgetragen. Es wurde das gleiche Vorgehen bei der Anpassung gewählt wie im Abschnitt 6.1.1. In diesem Beispiel ist die Abweichung von freier Diffusion im Nukleolus ausgeprägter als im restlichen Kern, d_w nähert sich dem bei der Perkolationschwelle erwarteten Wert an (Abschnitt 3.3.1). Vergleicht man Abb. 6.10 b und c, so erkennt man neben dem Verlust an Gesamtfluoreszenz, dass die Zelle sich während der Messreihe „gesenkt“ hat. In einem anderen Beispiel (Abb. 6.11) kommt es nahe der Kernmembran zu besonders anomaler Diffusion. Die Konzentration zeigt ebenso wie d_w keine allzu deutlichen Schwankungen.

In 70 kDa-Dextrane enthaltenden Zellen stellt sich eine etwas inhomogenere Verteilung der fluoreszenten Moleküle in dem hier betrachteten Zeitraum von einer Stunde nach Injektion ein (Abb. 6.12). Die Behinderung der Diffusion zeigt ebenfalls ausgeprägtere Variationen und scheint vor allem in der Nähe von Grenzen zwischen heller und dunkler fluoreszierenden Bereichen stärker zu sein, so z. B. an der Peripherie des Nukleolus und des Kerns.

Diskussion

Auch in Zellen injizierte synthetische Moleküle wie Dextrane zeigen in diesen ersten Experimenten behinderte Diffusion im Zellkern bei einer im Vergleich zu Wasser ca. 4fach höheren Viskosität. Es ist beobachtet worden, dass an der Peripherie des Nukleolus und auch des gesamten Kerns das Chromatin besonders kompakt ist (Abschnitt 2.1.2). Dies

korreliert mit der zum Teil hier gesehenen stärkeren Behinderung der Diffusion in diesen Bereichen, und auch im Nukleolus kommt es zu einer deutlicheren Behinderung, möglicherweise aufgrund einer dichteren räumlichen Organisation.

Je größer die Moleküle sind, umso inhomogener sind die Dextrane verteilt, und umso mehr variiert die Behinderung ihrer Diffusion. Dies könnte eine Aussage über die Zugänglichkeit bestimmter Bereiche wie etwa chromosomaler (Sub-)Domänen ermöglichen. Allerdings hat sich ein im Vergleich zu EGFP größerer mittlerer Behinderungsgrad ergeben, der für unterschiedliche Molekularmassen etwa gleich ist. Dies kann mit einer „Klebrigkeit“ der Dextranmoleküle im Kern erklärt werden, die einerseits stark genug ist, um zu einer zusätzlichen Anomalie der Diffusion zu führen (Abschnitt 3.3.2), andererseits die Dextrane nicht immobilisiert. Für qualitative Aussagen über den Zusammenhang zwischen der Kernstruktur und der Diffusion von Molekülen sind die einfach in der Größe skalierbaren Dextrane jedoch geeignet.

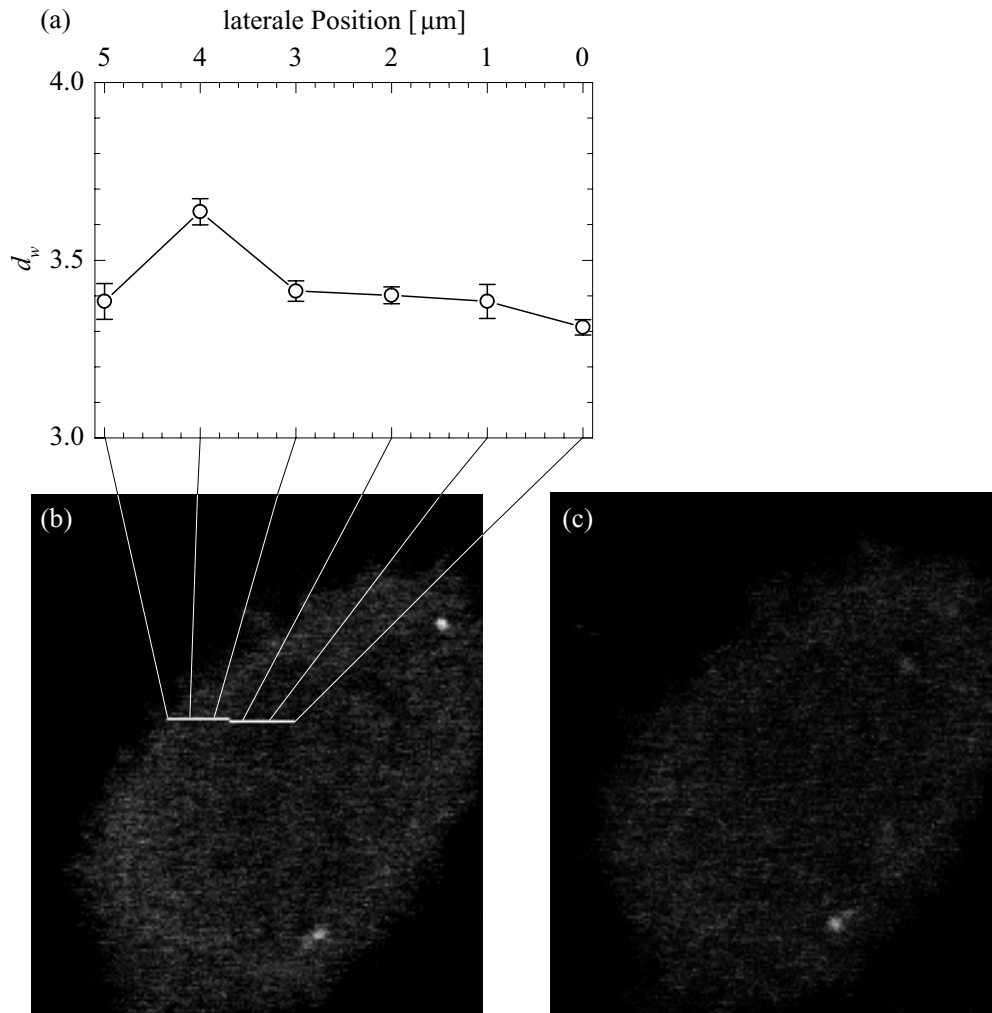


Abbildung 6.11: FCS-Scan durch einen 10 kDa-Dextrane enthaltenden HeLa-Kern: (a) Anomalieparameter d_w als Funktion der Position in der Zelle, (b) konfokales Fluoreszenzbild (180×210 Punkte, Pixelabstand 100 nm) mit den Positionen für FCS-Messungen vor und (c) nach dem FCS-Scan.

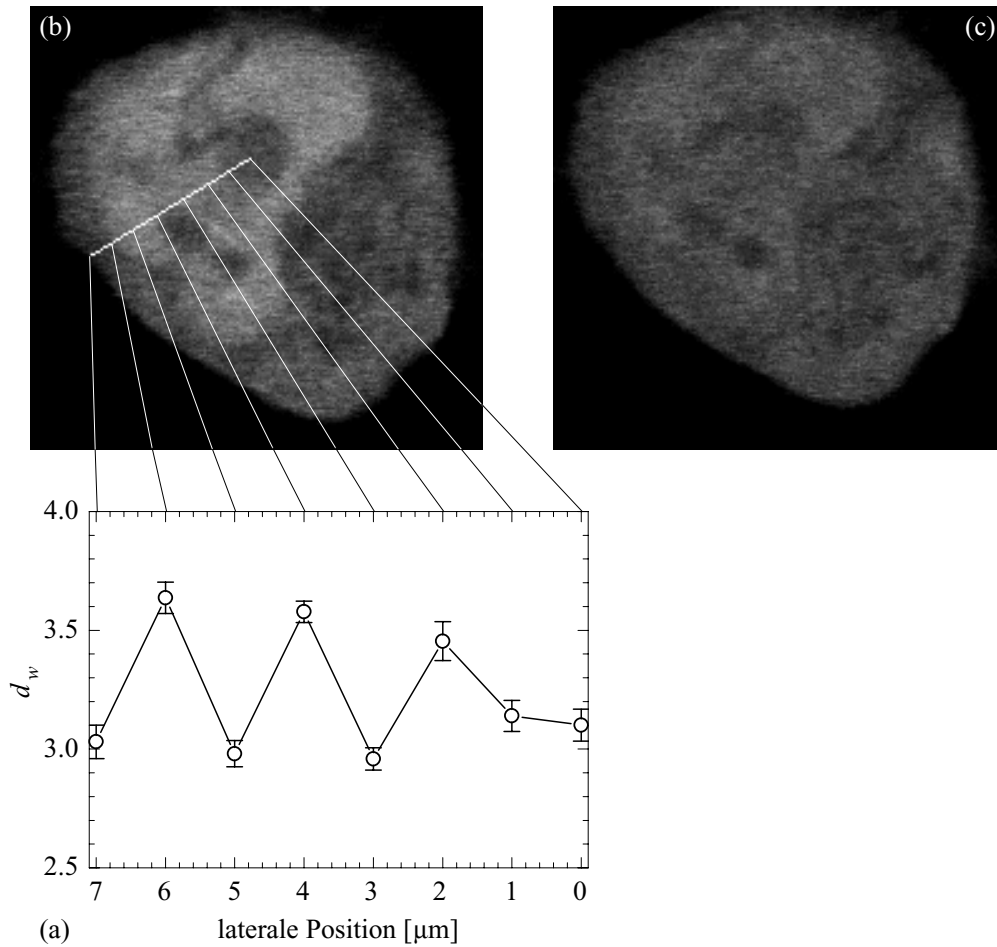


Abbildung 6.12: *FCS-Scan durch einen 70 kDa-Dextrane enthaltenden HeLa-Kern: (a) Anomalieparameter d_w als Funktion der Position in der Zelle, (b) konfokales Fluoreszenzbild (180×176 Punkte, Pixelabstand 100 nm) mit den Positionen für FCS-Messungen vor und (c) nach dem FCS-Scan.*

6.1.3 Alexa568 in LCLC-103H-Zellen

Eine *in vivo*-Fluoreszenzmarkierung des Chromatins im Zellkern erlaubt, das Diffusionsverhalten mit der räumlichen Struktur von Interphasechromosomen in Bezug zu setzen. Mit Hilfe von Fusionsproteinen von AFPs mit Histonen [60] und kombinierter FCS/CLSM kann angefärbtes Chromatin in lebenden Zellkernen strukturell untersucht und gleichzeitig die Diffusion spektral distinkter fluoreszenter Moleküle analysiert werden. In den Experimenten dieses Abschnitts (in Zusammenarbeit mit T. A. Knoch, Abt. Biophysik der Makromoleküle, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) und des folgenden wurde die Diffusion unterschiedlich großer Moleküle in Histon-AFP-Chimären-exprimierenden Zellen betrachtet.

Material und Methoden

Die Zelllinie LCLC-103H entstammt einem humanen Lungenkarzinom (large cell lung carcinoma). Ein stabiler Klon dieser Zelllinie von F. Bestvater (Abt. Biomedizinische Struk-

turanalyse, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) und T. A. Knoch exprimiert ein Histon-2A-EGFP-Fusionsprotein (H2A-EGFP) [66]. Zellen dieses Klon wurden wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben kultiviert. Für FCS-Experimente wurden sie in Kammerdeckgläsern ausgesät, für 48 Stunden mit Alexa568 mit einer Konzentration von 500 nM im Medium inkubiert und anschließend gewaschen. Für die Messungen wurden die Kammerdeckgläser bei Raumtemperatur auf dem Probentisch befestigt. Zur Kontrolle wurden auch nicht mit Fluorophorlösung inkubierte Zellen verwendet.

Die FCS-Messungen dieses Abschnitts wurden in dem beschriebenen Aufbau ohne Scanningeinheit mit dem Objektiv UPlanApo 60 \times /1.2W aufgenommen. Es wurden gleichzeitig das Fluoreszenzsignal von H2A-EGFP in Kanal 0 und die Signalkorrelationen von Alexa568 in Kanal 1 aufgenommen.

FCS-Linescans in Zellen

Wie schon bei den Messungen der Beweglichkeit von EGFP und EGFP- β -gal konnte auch in ohne Fluorophore inkubierten LCLC-103H-Zellen mit analogem Vorgehen gezeigt werden, dass die zelluläre Autofluoreszenz und das Übersprechen des ECFP im Detektionsspektrum von Kanal 1 gegenüber der Fluoreszenz von Alexa568 vernachlässigt werden kann, während die ECFP-Fluoreszenz im Kanal 0 bei Anregung mit 488 nm ein deutliches Signal ergibt. Im Epifluoreszenzmodus des Gerätes konnten Zellen in der Interphase anhand ihrer Chromatinstruktur ausgewählt werden. Es wurden Linien in Kernen dieser Zellen festgelegt, die nicht durch den Nukleolus verliefen und entlang denen FCS-Messungen an Punkten im Abstand von 0,5 μ m durchgeführt wurden. Insgesamt wurden mehrere hundert Punkte in mehr als 15 Zellen berücksichtigt.

Für jede Zelle wurde eine mittlere ECFP-Intensität bestimmt und die Werte darauf normiert. Überall war behinderte Diffusion ohne Immobilisierung der Farbstoffmoleküle zu beobachten, daher wurden die Korrelationsfunktionen von Alexa568 wie in Abschnitt 6.1.1 beschrieben an die entsprechende Modellfunktion angepasst. Der mittlere Anomalieparameter beträgt $2,9 \pm 0,3$ und ist damit z. B. dem von EGFP in COS-7- und AT-1-Zellen ähnlich. Für die relative Viskosität des Nukleoplasmas ergibt sich $4,0 \pm 0,7$, berechnet aus den mittleren Diffusionszeiten der Fluorophore *in vivo* und in wässriger Lösung. Wie Abb. 6.13 a zeigt, besteht keine Korrelation zwischen der Chromatindichte und dem Grad der Behinderungsdiffusion. Eine Korrelation würde zu einem linearen Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität von H2A-EGFP und dem Anomalieparameter führen, beide sind jedoch statistisch unabhängig voneinander verteilt.

6.1.4 DsRed in COS-7-Zellen

Material und Methoden

Zellen eines stabilen, ein Histon-2B-EGFP-Fusionsprotein (H2B-EGFP) exprimierenden HeLa-Klon von T. A. Knoch und W. Waldeck [66] wurden wie in Abschnitt 6.1.1 beschrieben mit Vektoren für DsRed (Abb. 6.14, *Clontech*) transient transfiziert. Diese Zellen wurden wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben in Kammerdeckgläsern kultiviert. Für Mikroskopie und FCS-Messungen wurden die Kammerdeckgläser bei Raumtemperatur auf dem Probentisch befestigt. Zur Kontrolle wurden auch nicht DsRed-exprimierende Zellen verwendet.

Die Bilder und FCS-Messungen dieses Abschnitts wurden in dem beschriebenen Aufbau mit der Scanningeinheit und dem Objektiv UPlanApo 60 \times /1.2W aufgenommen. Es wurden

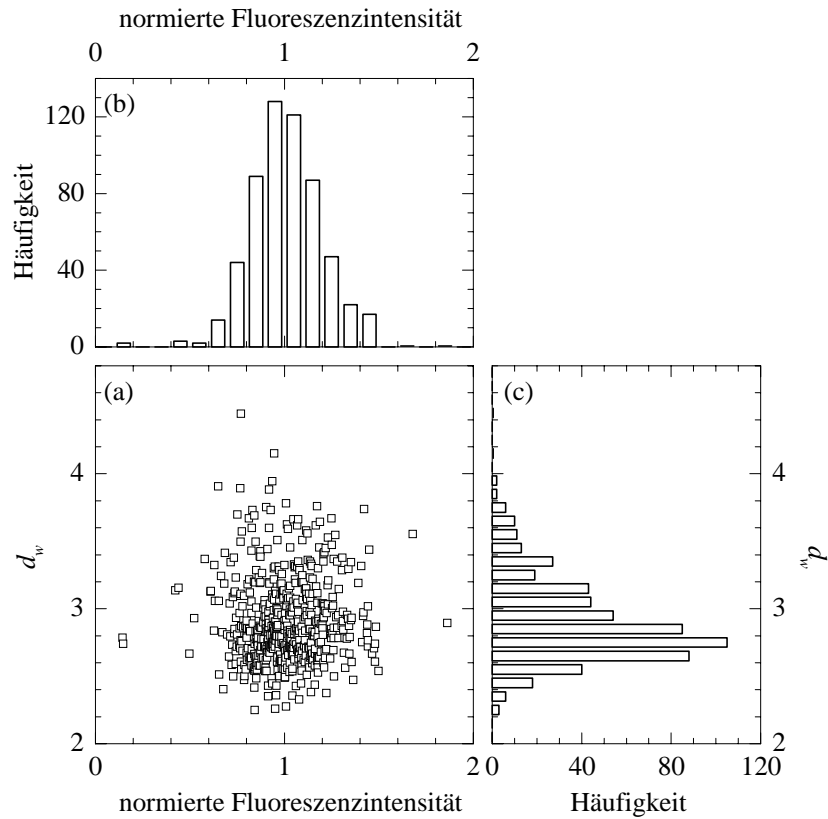


Abbildung 6.13: (a) Anomalieparameter d_w der Diffusion von Alexa568 als Funktion der H2A-ECFP-Intensität, (b) Histogramm der H2A-ECFP-Intensitätsverteilung und (c) Histogramm der Verteilung von d_w aus zahlreichen FCS-Messungen in H2A-ECFP-exprimierenden und Alexa568 enthaltenden LCLC-103H-Zellen.

gleichzeitig das Fluoreszenzsignal von H2B-EGFP in Kanal 0 und das von DsRed sowie seine Fluktuationen in Kanal 1 aufgenommen.

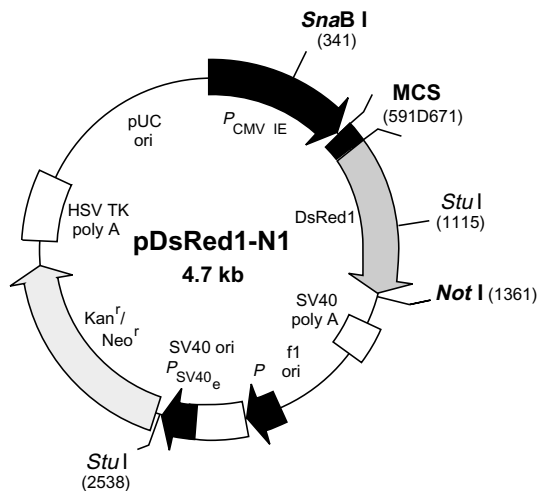


Abbildung 6.14: Plasmidkarte des DsRed-Expressionsvektors.

FCS-Linescans in Zellen

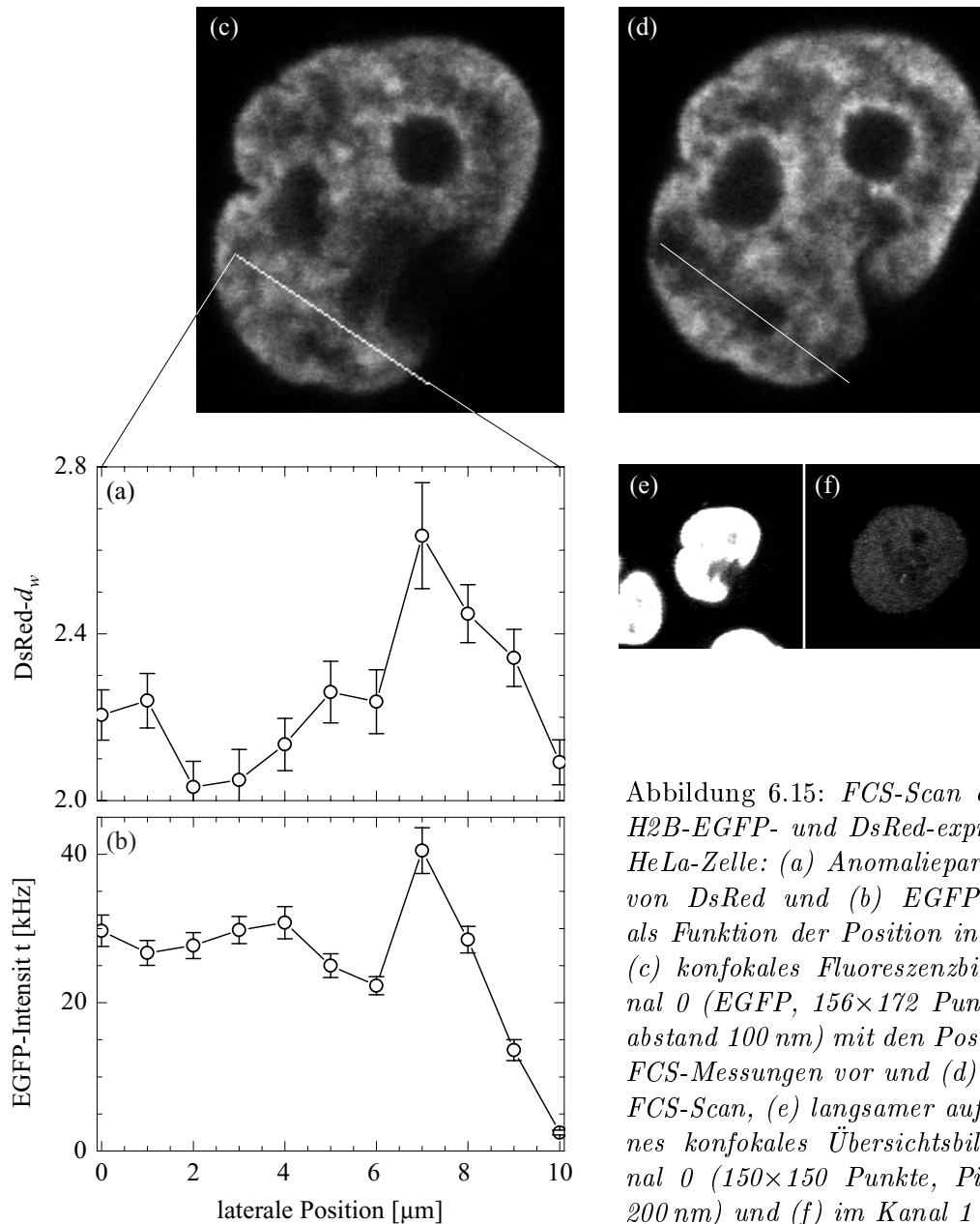


Abbildung 6.15: FCS-Scan durch eine H2B-EGFP- und DsRed-exprimierende HeLa-Zelle: (a) Anomalieparameter d_w von DsRed und (b) EGFP-Intensität als Funktion der Position in der Zelle, (c) konfokales Fluoreszenzbild im Kanal 0 (EGFP, 156×172 Punkte, Pixelabstand 100 nm) mit den Positionen für FCS-Messungen vor und (d) nach dem FCS-Scan, (e) langsamer aufgenommenes konfokales Übersichtsbild im Kanal 0 (150×150 Punkte, Pixelabstand 200 nm) und (f) im Kanal 1 (DsRed).

Wie schon bei den Messungen der Beweglichkeit von Alexa568 konnte auch in nicht DsRed-exprimierenden HeLa-Zellen mit analogem Vorgehen gezeigt werden, dass die zelluläre Autofluoreszenz und das Übersprechen des EGFP im Detektionsspektrum von Kanal 1 gegenüber der Fluoreszenz von DsRed vernachlässigt werden kann, während die EGFP-Fluoreszenz im Kanal 0 bei Anregung mit 488 nm ein deutliches Signal ergibt. Durch Aufnahme zweifarbiger konfokaler Bilder konnten Zellen in der Interphase anhand ihrer Chromatinstruktur ausgewählt werden, die gleichzeitig H2B-EGFP und DsRed exprimierten. Dessen rote Fluoreszenz war relativ gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt. Es wurden Linien in Kernen dieser Zellen festgelegt, die nicht durch den Nukleolus verliefen und entlang denen FCS-Messungen an Punkten im Abstand von 1 μm durchgeführt wurden. Nach

den FCS-Messungen wurde erneut ein Fluoreszenzbild aufgenommen, um den Verlust an Fluoreszenzintensität sichtbar zu machen und eventuelle Bewegungen der Zelle zu erkennen.

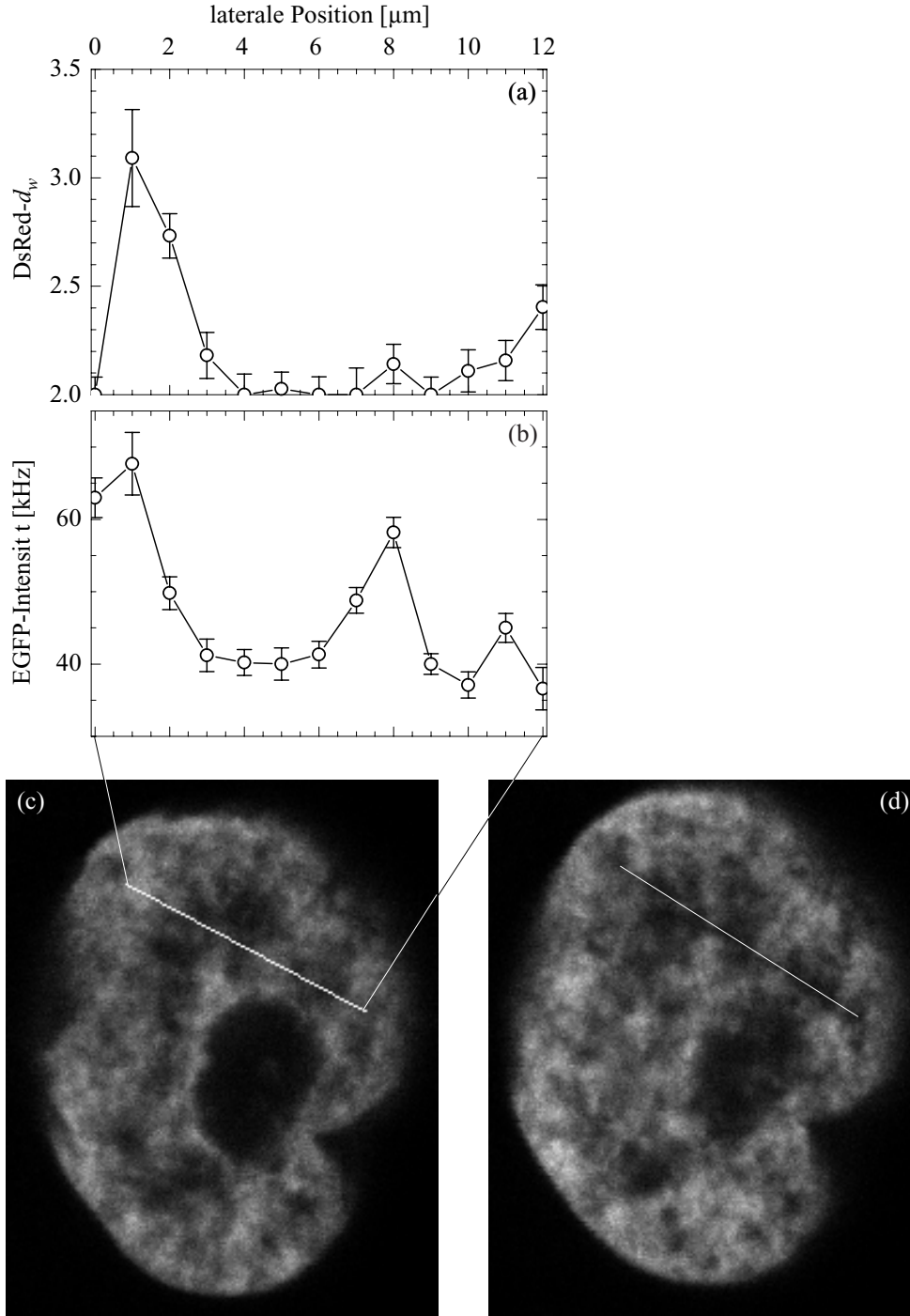


Abbildung 6.16: FCS-Scan durch eine H2B-EGFP- und DsRed-exprimierende HeLa-Zelle: (a) Anomalieparameter d_w von DsRed und (b) EGFP-Intensität als Funktion der Position in der Zelle, (c) konfokales Fluoreszenzbild im Kanal 0 (EGFP, 188×236 Punkte, Pixelabstand 100 nm) mit den Positionen für FCS-Messungen vor und (d) nach dem FCS-Scan.

Es konnte keine Immobilisierung der DsRed-Moleküle beobachtet werden. Sie zeigten überall im Kern behinderte Diffusion mit einem mittleren Anomalieparameter von $d_w = 2,2 \pm 0,3$ und einer Diffusionszeit von $\tau_{\text{diff}} = 2,0 \pm 0,7$ ms. Die nur geringe Anzahl an berücksichtigten Zellen führt zu den großen Standardabweichungen. Trotzdem lässt sich aus der in Abschnitt 6.1.2 bestimmten relativen nuklearen Viskosität von HeLa-Zellen der Diffusionskoeffizient der DsRed-Moleküle in Wasser zu $2,4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ abschätzen. Er ist bei gleicher molekularer Masse der Monomere deutlich kleiner als der von EGFP ($8,7 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), was auf die Bildung von Multimeren, vermutlich den bereits beobachteten Tetrameren, hindeutet [8].

Um die räumliche Abhängigkeit des Diffusionsverhaltens zu veranschaulichen, ist in Abb. 6.15 a der Anomalieparameter der Diffusion von DsRed aus der Anpassung der Korrelationsfunktionen an das Modell der behinderten Diffusion gegen die Position entlang der in c markierten Linie in einem HeLa-Kern aufgetragen. Dabei wurde ein nichtstrahlender Zustand angenommen mit einer Gleichgewichtsbesetzung von 0,3 und einer Zeitkonstante von $500 \mu\text{s}$ [56]. Es wurde das gleiche Vorgehen bei der Anpassung gewählt wie im Abschnitt 6.1.1. Abb. 6.15 c zeigt die Scanlinie, wie sie vor dem FCS-Scan ausgewählt wurde, und d die Linie, die man nach dem Scan durch Ausbleichen der EGFP-Intensität erkennen kann. Dieses ebenso wie ein weiteres Beispiel (Abb. 6.16) zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Dichte des durch EGFP-H2B markierten Chromatins und der Diffusionsbehinderung bestehen kann.

Diskussion

In den beiden Experimenten, in denen die Dichte des fluoreszenzmarkierten Chromatins mit den Eigenschaften der molekularen Diffusion in Bezug gesetzt worden ist, zeigten die Moleküle behinderte Diffusion. Die Viskosität für die Alexa488-Moleküle im Kern ist wiederum ca. 4fach höher als in Wasser, in guter Übereinstimmung mit den vorhergehenden Ergebnissen. Unklar ist, ob der z. B. EGFP ähnliche Anomalieparameter der Beweglichkeit von Alexa durch zusätzliche Klebrigkeit erhöht ist. Auf jeden Fall zeigt er für die kleinen Farbstoffmoleküle keine Korrelation mit der durch Histon-AFP-Chimären dargestellten Chromatindichte, während trotz der kleinen Zahl untersuchter Zellen die Beweglichkeit der größeren DsRed-Proteine durch das Chromatin beeinflusst zu sein scheint.

Daraus lässt sich schließen, dass für sehr kleine Teilchen selbst z. B. bewegliche Proteine von der Größe des EGFP eher Hindernisse darstellen, als zur Viskosität beizutragen (zum Vergleich können ein Tischtennis- und ein Basketball dienen). Für größere Teilchen, z. B. funktionelle Proteine oder Komplexe (Medizinbälle, um im Bild zu bleiben), tragen Moleküle der Größe des EGFP eher zur Viskosität bei, als hindernd zu wirken. Eine Behinderung der Beweglichkeit erfahren sie vor allem durch mehr oder weniger immobilisierte Strukturen wie etwa Chromatin. Eine Umorganisation der dreidimensionalen Kernstruktur z. B. durch Chromatin-(De-)Acetylierung könnte also die Zugänglichkeit von Bereichen für bestimmte Moleküle in Abhängigkeit von deren Größe definiert beeinflussen.

6.2 Bindung und Beweglichkeit funktioneller Proteine im Zellkern

Viele biologische Fragestellungen beschäftigen sich mit Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen, z. B. der Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA. Für Untersuchungen *in vitro* müssen die Wechselwirkungspartner aufgereinigt, aber unter möglichst physiologischen Bedingungen in Lösung vorliegen. Schwierig ist eine Untersuchung in lebenden Zellen und Geweben, da eine selektive Beobachtung der beteiligten Moleküle notwendig ist, ohne die komplexen intrazellulären Bedingungen zu stören. Die Entwicklung von autofluoreszenten Proteinen und fluoreszenzmikroskopischen Methoden wie FCS, FLIP und FRAP in den letzten Jahren bietet Möglichkeiten, Mobilitäten und Wechselwirkungen *in vivo* zu untersuchen. Im folgenden wird am Beispiel des Transkriptionsterminationsfaktors TTF-I in HeLa-Zellen ein gemeinsam mit T. Weidemann (Abt. Biophysik der Makromoleküle, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) entwickeltes und angewandtes Konzept vorgestellt, mit dem einstufige spezifische Bindungen in lebenden Zellen charakterisiert werden können.

6.2.1 Der Transkriptionsterminationsfaktor TTF-I in HeLa-Zellen

Eukaryotische ribosomale RNA (rRNA) ist der Hauptbestandteil der Ribosomen, der im Zytoplasma befindlichen Körper, in denen die Proteinbiosynthese stattfindet. Die für rRNA codierenden Gene befinden sich in Gruppen, die sich durch einen recht gleichmäßigen Wechsel von codierenden und nichtcodierenden Sequenzen auszeichnen. Die nichtcodierenden Bereiche enthalten den Promotor oberhalb (upstream, in 5'-Richtung bezogen auf den codierenden Strang) des Strukturgens, einen Transkriptionsterminator T_0 direkt vor dem Promotor und weitere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Weitere Kopien des Transkriptionsterminators, T_1 – T_{10} , befinden sich unterhalb (downstream, in 3'-Richtung) des codierenden Abschnitts. Zur Initiation der Transkription binden spezifische Faktoren an die entsprechenden Bindungsstellen und die RNA-Polymerase I an den Promotor. Der aus den Faktoren und der Polymerase gebildete Komplex fällt nach Beginn der Transkription wieder auseinander, und die Polymerase wandert in 3'-Richtung auf dem codierenden Strang und synthetisiert die RNA. Der Transkriptionsterminationsfaktor TTF-I bindet an eine der Terminatorsequenzen T_1 – T_{10} und stoppt die Polymerase. Die für rRNA codierenden Bereiche befinden sich *in vivo* im Nukleolus, alle anderen Gene werden von den RNA-Polymerasen II und III außerhalb des Nukleolus abgelesen.

Es ist *in vitro* beobachtet worden, dass die Existenz des Terminators T_0 die Transkriptionsinitiation erleichtert, eventuell durch Bindung von TTF-I, das eine mögliche Transkription des nichtcodierenden Bereichs stoppt und den folgenden Promotor davor schützt, blockiert zu werden [51]. Allerdings beeinflusst die Bindung von TTF-1 an reine DNA die Transkription nicht. Weitere Ergebnisse [74, 73] legen die Vorstellung nahe, dass an T_0 in Chromatin gebundenes TTF-1 das Chromatin in einem mehrstufigen Prozess umorganisiert, z. B. die Nukleosomen so im Bereich des Promotors verschiebt oder ihre Bindung lockert, dass der Transkriptionskomplex besonders effizient binden kann. TTF-1 hat also mindestens zwei Funktionen, die seine Bindung an Chromatin im Nukleolus erfordern.

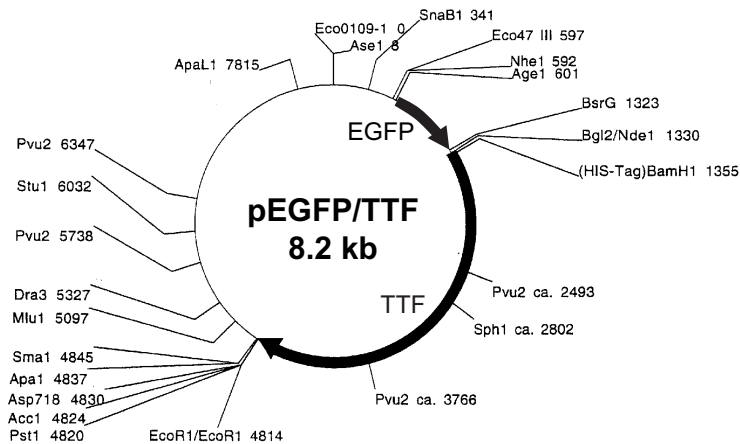


Abbildung 6.17: Plasmidkarte des EGFP-TTF-I-Expressionsvektors, abgeleitet aus dem Vektor pVL-TTF. Das TTF-I-Gen wurde an den Restriktionsschnittstellen NdeI und EcoRI ausgeschnitten und in die Multiple Cloning Site (MCS) des pEGFP-C1-Vektors von Clontech (Abb. 6.1) eingefügt.

Material und Methoden

HeLa-Zellen wurden wie in Abschnitt 6.1.1 beschrieben mit Vektoren für ein Fusionsprotein des Transkriptionsterminationsfaktor TTF-I mit EGFP (TTF-I-EGFP, Abb. 6.17, G. Müller, Abt. Biophysik der Makromoleküle, U. Hoffmann-Rohrer, Abt. Molekularbiologie der Zelle II, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) transient transfiziert. Diese Zellen wurden wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben in Kammerdeckgläsern kultiviert. Für Mikroskopie und FCS-Messungen wurden die Kammerdeckgläser bei Raumtemperatur auf dem Probentisch befestigt.

Die Bilder, FLIP- und FCS-Messungen dieses Abschnitts wurden in dem beschriebenen Aufbau mit der Scanningeinheit und dem Objektiv UPlanApo 60 \times /1.2W aufgenommen.

FLIP- und FCS-Messungen

Wie schon in Abschnitt 6.1.2 gesehen, kann die zelluläre Autofluoreszenz von HeLa-Zellen gegenüber der EGFP-Fluoreszenz vernachlässigt werden. Anhand der Aufnahme kombinierter Fluoreszenz- und Durchlichtbilder konnten TTF-I-EGFP-exprimierende Zellen ausgewählt werden. Diese zeichneten sich durch eine deutliche Lokalisierung der Fluoreszenz in den Nukleoli aus, wie konfokale Fluoreszenzbilder des Kerns zeigten. Ein Punkt in einem Nukleolus wurde ausgewählt und dort das ausbleichende Fluoreszenzsignal als Funktion der Zeit gemessen. Anschließend wurde erneut ein Fluoreszenzbild aufgenommen sowie FCS-Messungen im Nukleolus und im Kern außerhalb der Nukleoli durchgeführt.

Das Beispiel in Abb. 6.18 zeigt die Ergebnisse eines solchen Experiments: Am in b markierten Punkt im größten Nukleolus in der Mitte wurde eine FLIP-Messung, c, aufgenommen. Anschließend war das gesamte Fluoreszenzsignal sowohl im gebleichten als auch in den anderen Nukleoli oberhalb bzw. rechts davon deutlich verringert. Trotz der Lokalisierung, die durch Bindung zustande kommen muss, erfahren die Moleküle also einen schnellen Austausch zwischen den Nukleoli. Eine Anpassung der experimentellen an eine theoretische FLIP-Kurve, die Summe der Gl. (3.119) und (3.122), nach dem in Abschnitt 3.5.3 vorgestellten Modell des Bindungsgleichgewichts mit schnellem Austausch ergab einen immobilisierten Anteil von $65 \pm 2\%$ sowie eine Dissoziationsrate der Bindung von $k_{\text{off}} = 0,034 \pm 0,025 \text{ s}^{-1}$, entsprechend einer Lebensdauer des gebundenen Zustandes von 29 s.

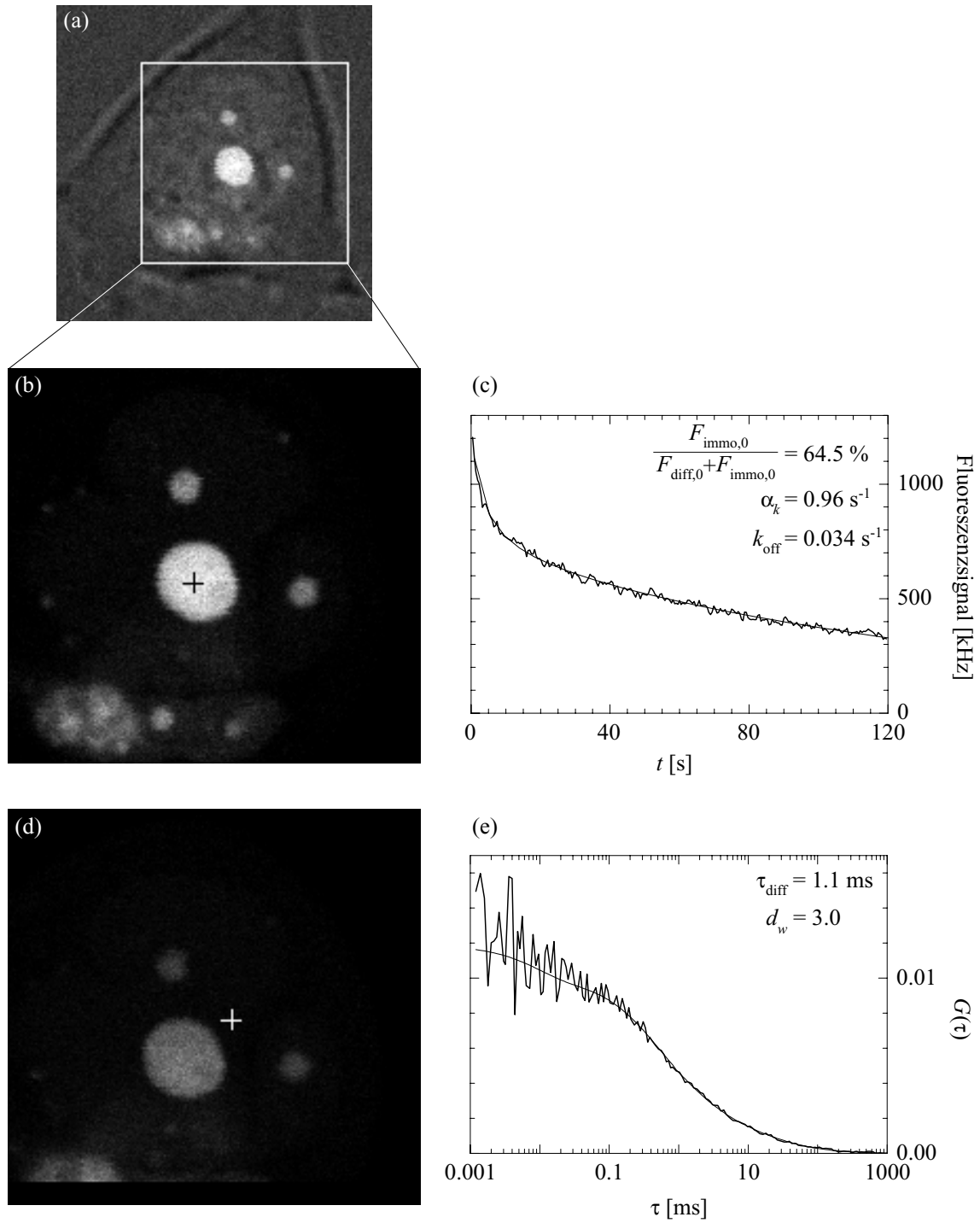


Abbildung 6.18: FLIP- und FCS-Messungen in einer TTF-I-EGFP-exprimierenden HeLa-Zelle: (a) kombiniertes Durchlicht- und Fluoreszenz-Übersichtsbild (300x300 Punkte, Pixelabstand 200 nm), (b) konfokales Fluoreszenzbild (196x188 Punkte, Pixelabstand 100 nm) des Ausschnitts aus (a) mit markierter Position für (c) FLIP-Messung im Nukleolus (dick: gemessene Kurve, dünn: angepasste Modellfunktion) (d) Wiederholung von (b) nach dem Bleaching mit markierter Position für (e) FCS-Messung im Kern (dick: gemessene Kurve, dünn: angepasste Modellfunktion).

Die FCS-Messung im Nukleolus erforderte die Anpassung von zwei Komponenten mit je einem Anomalieparameter. Die erste Komponente zeigte behinderte Diffusion mit einer Diffusionszeit $\tau_{\text{diff},1} \sim 3$ ms und einem Anomalieparameter $d_{w,1} > 2$, die zweite zeigte eingeschränkte Diffusion mit einer Diffusionszeit $\tau_{\text{diff},2} \sim 250$ ms und einem Anomalieparameter $d_{w,2} < 2$. Die schnelle Komponente kann ungebundenen TTF-I-Molekülen zugeordnet werden, während die langsame möglicherweise an Strukturen gebunden ist, die räumlich eingeschränkte Diffusion wie in Abschnitt 3.3 beschrieben zeigen.

An eine Korrelationsmessung, Abb. 6.18 e, außerhalb des Nukleolus an der in d markierten Position konnte behinderte Diffusion ohne Immobilisierung mit einer Diffusionszeit $\tau_{\text{diff}} = 1,1 \pm 0,1$ ms und einem Anomalieparameter $d_{w,1} = 3,0 \pm 0,1$ angepasst werden, dabei wurden für die nichtstrahlenden Zustände die in Abschnitt 6.1.1 für EGFP ermittelten Parameter verwendet.

In weiteren Zellen konnte qualitativ die gleichen Beobachtungen gemacht werden, insbesondere ergaben Bleaching-Kurven variierende immobilisierte Anteile zwischen 65 und 93 %. Die Dissoziationskonstante bzw. die Lebensdauer des gebundenen Zustandes jedoch zeigten nur geringe Schwankungen von Zelle zu Zelle und ergaben

$$\begin{aligned} k_{\text{off}} &= 0,037 \pm 0,005 \text{ s}^{-1} \\ \tau_{\text{immo}} &= 27 \pm 3 \text{ s.} \end{aligned} \tag{6.4}$$

Diskussion

Obwohl nur wenige Zellen untersucht wurden, kann folgendes Modell aufgestellt werden: Der Faktor TTF-I ist vorwiegend im Nukleolus zu finden, in Übereinstimmung mit den Erwartungen. Ein Großteil der Moleküle liegt in gebundenem Zustand vor, dessen Lebensdauer abgeschätzt werden kann. Außerhalb der Nukleoli sind die Proteine abgesehen von Diffusionsbehinderung frei beweglich, so dass es zu schnellem Austausch zwischen den Nukleoli kommen kann. Die TTF-I-Moleküle sind daher nicht in Nukleoli eingeschlossen oder unbeweglich, sondern nur durch unterschiedliche Konzentrationen unterschiedlicher Bindungsstellen im Nukleolus angereichert. Transportprozesse scheinen ausschließlich diffusionskontrolliert zu sein.

Die Kombination aus konfokaler Mikroskopie, FCS und FLIP – Fluoreszenzfluktuationsmikroskopie – erlaubt eine quantitative Analyse der Beweglichkeit, der räumlichen Verteilung und des Bindungsverhaltens von fluoreszenzmarkierten Makromolekülen, wie an diesem Beispiel gezeigt wurde.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss der dreidimensionalen Organisation des Zellkerns auf molekulare Mobilitäten zu untersuchen. Dazu wurden Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM) zur Fluoreszenzfluktuationmikroskopie (FFM) theoretisch und experimentell verbunden und angewendet.

Theorie

Im theoretischen Teil wurden die gemeinsamen Grundlagen der FCS und der CLSM betrachtet. Der Einfluss zellulärer Strukturen auf experimentell zugängliche Korrelationsfunktionen konnte beschrieben werden und manifestiert sich in einer Abweichung von freier Diffusion.

In der Zelle finden sich statistisch organisierte Hindernisse, wie sie Polymersysteme darstellen, Systeme von Grenzflächen wie zellulären Membranen und geschlossene Kompartimente. Das hier auf die FCS angewandte phänomenologische Modell der behinderten oder anomalen Diffusion erwies sich dabei als allgemein verwendbar, so dass einerseits *a priori* keine zusätzlichen Annahmen über die Ursachen der Abweichungen von idealem Diffusionsverhalten gemacht werden müssen, andererseits die Ursachen nur durch ergänzende Beobachtungen herausgefunden werden können.

Viele biologisch relevante Moleküle sind in einer Zelle oft nicht frei beweglich, sondern stehen in einem Bindungsgleichgewicht mit immobilisierten Partnern. Es konnte gezeigt werden, dass sich bereits relativ kurzlebige spezifische Bindungen durch eine verlängerte Aufenthaltsdauer im Fokus beschreiben lassen, während sich unspezifische Bindungen erst bei einer recht breiten Verteilung der Bindungsenergie auf das Diffusionsverhalten auswirken. Wenn sich die Bindungsstellen auf einem Polymer wie Chromatin befinden, so kann räumlich beschränkte Diffusion des Polymers zusammen mit gebundenen fluoreszenten Molekülen ebenfalls Signalfluktuations hervorrufen. Auch auf diesen Fall konnte die Theorie der FCS angepasst werden.

Darüberhinaus wurde in Erweiterung bestehender Theorien gezeigt, dass auch intramolekulare Fluktuationen der räumlichen oder der elektronischen Konfiguration mit FCS charakterisiert werden können.

Aufbau des Prototypen

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurde ein bestehender und im Laborbetrieb bewährter FCS-Aufbau um eine Scanningeinheit erweitert, um ein Fluoreszenzfluktuationsmikro-

skop (FFM) aufzubauen. Das an den Kameraausgang eines kommerziellen inversen Labormikroskops angeschlossene System besitzt einen kompakten modularen Aufbau, eine gute optomechanische Stabilität und die Möglichkeit, in zwei spektralen Kanälen zu messen. Für den Aufbau war es wichtig, eine schnelle, reproduzierbare und stabile Positionierung zu erreichen, um einerseits Fluoreszenzbilder zur Orientierung in einer Zelle und zur quantitativen Analyse aufnehmen, andererseits an definierten Positionen FCS- und andere Messungen durchführen zu können. Letzteres ist mit kommerziellen CLSM-Geräten i. a. nicht möglich.

Realisiert wurde das FFM mit zwei Galvanometerscannern, die zusammen mit einer Scanlinse einen gemeinsamen Beleuchtungs- und Detektionsfokus in der Zwischenbildebene des Mikroskops wohldefiniert positionieren können. Die Abbildung in die bzw. aus der Probe erfolgt dann durch die Optik des Mikroskops, während der eigentliche konfokale Strahlengang vom FCS-Modul bereitgestellt wird. Die optische Charakterisierung zeigte, dass die Auflösung nahe der Beugungsgrenze dieses Aufbaus liegt. Weitere Eigenschaften wie Abbildungsmaßstab und Reproduzierbarkeit und Stabilität der Positionierung entsprechen den durch die verwendeten Komponenten vorgegebenen Eigenschaften.

Experimente

Am Beispiel von EGFP konnten intramolekulare Fluktuationen mit FCS identifiziert und quantitativ beschrieben werden.

Messungen der Beweglichkeit von Molekülen in Zellen wurden sowohl ohne als auch mit der Scanningeinheit durchgeführt, ohne dass ein systematischer Unterschied der Ergebnisse zu erkennen war. Aus den Experimenten konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Alle inerten Moleküle zeigen eine ortsabhängige Abweichung von idealer freier Diffusion, die am besten mit dem Modell der behinderten oder anomalen Diffusion interpretiert werden kann.
- Aus dem Vergleich von funktionslosen synthetischen Molekülen mit inerten autofluoreszenten Proteinen kann abgeleitet werden, dass synthetische Moleküle oft unspezifische Bindungen mit zellulären Strukturen eingehen (Klebrigkeit).
- Kleine Moleküle zeigen keine Abhängigkeit des Diffusionsverhaltens von der Chromatinstruktur, für größere scheint hingegen ein Zusammenhang zu bestehen.
- Funktionelle Proteine binden an Strukturen, die eingeschränkte Diffusion erfahren und im Vergleich zur freien Diffusion langsame Fluktuationen erzeugen.

Damit kann folgendes Modell aufgestellt werden: Der größte Volumenanteil des Zellkerns ist ähnlich dem Zytoplasma von einem Nukleosol erfüllt, das aus Molekülen und Komplexen verschiedenster Größen in einer flüssigen Phase besteht. Für kleine Testmoleküle erscheinen die meisten davon neben den „statischen“ Strukturen wie Chromatin als Hindernisse, während sie z. B. für größere Proteine zur Viskosität beitragen. Mit zunehmender Größe des betrachteten Teilchens zeigt die Diffusion also eine zunehmende Abhängigkeit von höher organisierten Strukturen.

Bleaching-Experimente zeigten, dass viele in mikroskopischen Bildern statisch anmutende Strukturen sehr viel dynamischer organisiert sind und vor allem durch lokal variierende Bindungsaffinitäten stabilisiert werden. Funktionelle Proteine scheinen diffusiv den Kern abzusuchen, bis sie erneut eine Bindungsstelle finden.

Literaturverzeichnis

- [1] J. R. Abney, B. Cutler, M. L. Fillbach, D. Axelrod und B. A. Scalettar. Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implications for nuclear structure. *J. Cell Biol.*, 137(7):1459, 1997.
- [2] S. A. Adam. Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11(3):402, 1999.
- [3] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. D. Watson. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, New York/London, 3. Auflage, 1994.
- [4] ALV Laser GmbH. *ALV-5000/E Reference Manual*. Langen, 1998.
- [5] V. Andresen, A. Egner und S. W. Hell. Time-multiplexed multifocal multiphoton microscope. *Opt. Lett.*, 26(2):75, 2001.
- [6] S. R. Aragón und R. Pecora. Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J. Chem. Phys.*, 64(4):1791, 1976.
- [7] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson und W. W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.*, 16(9):1055, 1976.
- [8] G. S. Baird, D. A. Zacharias und R. Y. Tsien. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(22):11984, 2000.
- [9] T. Basché, W. E. Moerner, M. Orrit und H. Talon. Photon antibunching in the fluorescence of a single dye molecule trapped in a solid. *Phys. Rev. Lett.*, 69(10):1516, 1992.
- [10] K. M. Berland, P. T. So, Y. Chen, W. W. Mantulin und E. Gratton. Scanning 2-photon fluctuation correlation spectroscopy – particle counting measurements for detection of molecular aggregation. *Biophys. J.*, 71(1):410, 1996.
- [11] K. M. Berland, P. T. So und E. Gratton. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: Method and application to the intracellular environment. *Biophys. J.*, 68(2):694, 1995.
- [12] B. Berne und R. Pecora. *Dynamic Light Scattering*. John Wiley & Sons, New York, 1976.
- [13] A. Blumen, J. Klafter, B. S. White und G. Zumofen. Continuous-time random walks on fractals. *Phys. Rev. Lett.*, 53(14):1301, 1984.

- [14] A. Blumen, J. Klafter und G. Zumofen. Recombination in amorphous materials as a continuous-time random-walk problem. *Phys. Rev. B*, 27(6):3429, 1983.
- [15] G. Bonnet, O. Krichevsky und A. Libchaber. Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(15):8602, 1998.
- [16] K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormo und S. J. Remington. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(6):2306, 1997.
- [17] R. Brock, M. A. Hink und T. M. Jovin. Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence. *Biophys. J.*, 75(5):2547, 1998.
- [18] R. Brock, G. Vamosi, G. Vereb und T. M. Jovin. Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(18):10123, 1999.
- [19] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajev, G. Musiol und H. Mühlig. *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main/Thun, 3. Auflage, 1997.
- [20] A. Bunde und S. Havlin, Hrsg. *Fractals and Disordered Systems*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 2. Auflage, 1995.
- [21] C. R. Cantor und P. R. Schimmel. *Biophysical Chemistry. Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, Band 1. Freeman, New York, 1980.
- [22] C. R. Cantor und P. R. Schimmel. *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for The Study of Biological Structure and Function*, Band 2. Freeman, New York, 1980.
- [23] M. Carmo-Fonseca, L. Mendes-Soares und I. Campos. To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.*, 2(6):E107, 2000.
- [24] M. Chattoraj, B. A. King, G. U. Bublitz und S. G. Boxer. Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(16):8362, 1996.
- [25] D. Chen und S. Huang. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J. Cell Biol.*, 153(1):169, 2001.
- [26] Y. Chen, J. D. Müller, K. M. Berland und E. Gratton. Fluorescence fluctuation spectroscopy. *Methods*, 19(2):234, 1999.
- [27] Y. Chen, J. D. Müller, P. T. So und E. Gratton. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.*, 77(1):553, 1999.
- [28] Clontech Laboratories, Inc. *Living Colors User Manual*. Palo Alto, 2000.
- [29] N. B. Cole, C. L. Smith, N. Sciaky, M. Terasaki, M. Edidin und J. Lippincott-Schwartz. Diffusional mobility of golgi proteins in membranes of living cells. *Science*, 273(5276):797, 1996.

- [30] T. M. Creemers, A. J. Lock, V. Subramaniam, T. M. Jovin und S. Volker. Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning. *Nat. Struct. Biol.*, 6(6):557, 1999.
- [31] T. M. Creemers, A. J. Lock, V. Subramaniam, T. M. Jovin und S. Volker. Photo-physics and optical switching in green fluorescent protein mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(7):2974, 2000.
- [32] T. Cremer und C. Cremer. Chromosome territories, nuclear architecture, and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Gen.*, 2(4):292, 2001.
- [33] T. Cremer, A. Kurz, R. Zirbel, S. Dietzel, B. Rinke, E. Schrock, M. R. Speicher, U. Mathieu, A. Jauch, P. Emmerich *et al.* Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 58:777, 1993.
- [34] J. E. Darnell, H. F. Lodish und D. Baltimore. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books/Freeman, New York, 2. Auflage, 1990.
- [35] W. Demtröder. *Laser Spectroscopy – Basic Concepts and Instrumentation*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 2. Auflage, 1996.
- [36] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien und W. E. Moerner. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388(6640):355, 1997.
- [37] M. Ehrenberg und R. Rigler. Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuation. *Chem. Phys.*, 4:390, 1974.
- [38] J. Ellenberg, J. Lippincott-Schwartz und J. F. Presley. Dual-colour imaging with GFP variants. *Trends Cell. Biol.*, 9(2):52, 1999.
- [39] E. L. Elson und D. Magde. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13:1, 1974.
- [40] E. L. Elson, J. Schlessinger, D. E. Koppel, D. Axelrod und W. W. Webb. Measurement of lateral transport on cell surfaces. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 9:137, 1976.
- [41] P. F. Fahey, D. E. Koppel, L. S. Barak, D. E. Wolf, E. L. Elson und W. W. Webb. Lateral diffusion in planar lipid bilayers. *Science*, 195:305, 1977.
- [42] P. J. Flory. *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. John Wiley & Sons, New York, 1969.
- [43] M. F. Garcia-Parajo, G. M. Segers-Nolten, J. Veerman, J. Greve und N. F. van Hulst. Real-time light-driven dynamics of the fluorescence emission in single green fluorescent protein molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(13):7237, 2000.
- [44] M. F. Garcia-Parajo, J. A. Veerman, G. M. Segers-Nolten, B. G. de Grooth, J. Greve und N. F. van Hulst. Visualising individual green fluorescent proteins with a near field optical microscope. *Cytometry*, 36(3):239, 1999.
- [45] Y. Gefen und A. Aharony. Anomalous diffusion on percolating clusters. *Phys. Rev. Lett.*, 50(1):77, 1983.

- [46] A. Gennerich und D. Schild. Fluorescence correlation spectroscopy in small cytosolic compartments depends critically on the diffusion model used. *Biophys. J.*, 79(6):3294, 2000.
- [47] P. G. de Gennes. La percolation: Un concept unificateur. *La recherche*, 72:919, 1976.
- [48] A. Y. Grosberg und A. R. Khokhlov. *Statistical Physics of Macromolecules*. AIP Press, New York, 1994.
- [49] L. A. Gross, G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldrige und R. Y. Tsien. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(22):11990, 2000.
- [50] Y. Gruenbaum, K. L. Wilson, A. Harel, M. Goldberg und M. Cohen. Review: Nuclear lamins – structural proteins with fundamental functions. *J. Struct. Biol.*, 129(2/3):313, 2000.
- [51] I. Grummt, H. Rosenbauer, I. Niedermeyer, U. Maier und A. Ohrlein. A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell*, 45(6):837, 1986.
- [52] R. Guenther. *Modern Optics*. John Wiley & Sons, New York, 1990.
- [53] M. Hammermann. *Strukturuntersuchungen mit Neutronenkleinwinkelstreuung an superhelikaler DNA und Oligonukleosomen*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1999.
- [54] U. Haupts, S. Maiti, P. Schwille und W.W. Webb. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(23):13573, 1998.
- [55] S. Havlin, Z. V. Djordjevic, I. Majid, H. E. Stanley und G. H. Weiss. Relation between dynamic transport properties and static topological structure for the lattice-animal model of branched polymers. *Phys. Rev. Lett.*, 53(2):178, 1984.
- [56] A. A. Heikal, S. T. Hess, G. S. Baird, R. Y. Tsien und W. W. Webb. Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: Coral red (DsRed) and yellow (Citrine). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(22):11996, 2000.
- [57] S. Inoué. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In J. B. Pawley, Hrsg., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, S. 1. Plenum Press, New York, 2. Auflage, 1995.
- [58] I. Janke, J. Swoger, M. Wachsmuth, J. Langowski und E. H. K. Stelzer. In Vorbereitung.
- [59] N. G. van Kampen. *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 2. Auflage, 1992.
- [60] T. Kanda, K. F. Sullivan und G. M. Wahl. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.*, 8(7):377, 1998.

- [61] H. P. Kao, J. R. Abney und A. S. Verkman. Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm. *J. Cell Biol.*, 120(1):175, 1993.
- [62] P. Kask, K. Palo, N. Fay, L. Brand, U. Mets, D. Ullmann, J. Jungmann, J. Pschorr und K. Gall. Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: Theory and applications. *Biophys. J.*, 78(4):1703, 2000.
- [63] P. Kask, K. Palo, D. Ullmann und K. Gall. Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(24):13756, 1999.
- [64] G. S. Kino. Intermediate optics in nipkow disk microscopes. In J. B. Pawley, Hrsg., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, S. 155. Plenum Press, New York, 2. Auflage, 1995.
- [65] M. Kneen, J. Farinas, Y. Li und A. S. Verkman. Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys. J.*, 74(3):1591, 1998.
- [66] T. A. Knoch, W. Waldeck, G. Müller, A. Alonso und J. Langowski. DNA-Sequenz und Verfahren zur *in vivo*-Markierung und Analyse von DNA/Chromatin in Zellen. *Deutsche Patentanmeldung 100 13 204.9*, 2000.
- [67] D. Koppel. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. A*, 10:1938, 1974.
- [68] D. E. Koppel, D. Axelrod, J. Schlessinger, E. L. Elson und W. W. Webb. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophys. J.*, 16:1315, 1976.
- [69] D. E. Koppel, F. Morgan, A. E. Cowan und J. H. Carson. Scanning concentration correlation spectroscopy using the confocal laser microscope. *Biophys. J.*, 66(2/I):502, 1994.
- [70] U. Kubitscheck, M. Tschodrich-Rotter, P. Wedekind und R. Peters. Two-photon scanning microphotolysis for three-dimensional data storage and biological transport measurements. *J. Microscopy*, 182(3):225, 1996.
- [71] D. C. Lamb, A. Schenk, C. Rocker, C. Scalfi-Happ und G. U. Nienhaus. Sensitivity enhancement in fluorescence correlation spectroscopy of multiple species using time-gated detection. *Biophys. J.*, 79(2):1129, 2000.
- [72] J. Langowski, M. Wachsmuth, K. Rippe und M. Tewes. Biomolecular shape and interactions determined by fluorescence correlation spectroscopy. In J.-P. Frénoy, Hrsg., *Energies et Forces de l'Interaction entre Macromolécules Biologiques: L'Aspect Quantitatif*, Band 2 aus *Les Ecoles Physique et Chimie du Vivant*, S. 65. Publications CNRS, Paris, 2000.
- [73] G. Längst, P. B. Becker und I. Grummt. TTF-I determines the chromatin architecture of the active rDNA promoter. *EMBO J.*, 17(11):3135, 1998.
- [74] G. Längst, T. A. Blank, P. B. Becker und I. Grummt. RNA polymerase I transcription on nucleosomal templates: The transcription termination factor TTF-I induces chromatin remodeling and relieves transcriptional repression. *EMBO J.*, 16(4):760, 1997.

- [75] H. Leonhardt, H. P. Rahn, P. Weinzierl, A. Sporbert, T. Cremer, D. Zink und M. C. Cardoso. Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J. Cell Biol.*, 149(2):271, 2000.
- [76] K. Luby-Phelps. Physical properties of cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6(1):3, 1994.
- [77] K. Luby-Phelps, P. E. Castle, D. L. Taylor und F. Lanni. Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(14):4910, 1987.
- [78] K. Luby-Phelps, S. Mujumdar, R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, W. Galbraith und A. S. Waggoner. A novel fluorescence ratiometric method confirms the low solvent viscosity of the cytoplasm. *Biophys. J.*, 65(1):236, 1993.
- [79] K. Luby-Phelps, D. L. Taylor und F. Lanni. Probing the structure of cytoplasm. *J. Cell Biol.*, 102(6):2015, 1986.
- [80] G. L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman und A. S. Verkman. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.*, 275(3):1625, 2000.
- [81] D. Magde, E. L. Elson und W. W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system – measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29:705, 1972.
- [82] D. Magde, E. L. Elson und W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers*, 13(1):29, 1974.
- [83] A. G. Matera. Nuclear bodies: Multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.*, 9(8):302, 1999.
- [84] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov und S. A. Lukyanov. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat. Biotech.*, 17(10):969, 1999.
- [85] U. Meseth, T. Wohland, R. Rigler und H. Vogel. Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys. J.*, 76(3):1619, 1999.
- [86] T. Misteli. Protein dynamics: Implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, 291(5505):843, 2001.
- [87] T. Misteli, A. Gunjan, R. Hock, M. Bustin und D. T. Brown. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, 408(6814):877, 2000.
- [88] W. E. Moerner und M. Orrit. Illuminating single molecules in condensed matter. *Science*, 283(5408):1670, 1999.
- [89] R. D. Moir, M. Yoon, S. Khuon und R. D. Goldman. Nuclear lamins A and B1: Different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J. Cell Biol.*, 151(6):1155, 2000.
- [90] J. D. Müller, Y. Chen und E. Gratton. Resolving heterogeneity on the single molecular level with the photon-counting histogram. *Biophys. J.*, 78(1):474, 2000.

- [91] C. Münkkel, R. Eils, D. Zink, S. Dietzel, T. Cremer und J. Langowski. Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment. *J. Mol. Biol.*, 285(3):1053, 1999.
- [92] C. Münkkel und J. Langowski. Chromosome structure described by a polymer model. *Phys. Rev. E*, 57(5-B):5888, 1998.
- [93] J. F. Nagle. Long tail kinetics in biophysics? *Biophys. J.*, 63(2):366, 1992.
- [94] H. Naumann und G. Schröder. *Bauelemente der Optik*. Carl Hanser Verlag, München/Wien, 1992.
- [95] J. A. Nickerson. Experimental observations of a nuclear matrix. *J. Cell Sci.*, 114:463, 2001.
- [96] Omega Optical, Inc. Curv-o-matic. <http://www.omegafilters.com>, 2000.
- [97] S. Paillason, M. van de Corput, R.W. Dirks, H.J. Tanke, M. Robert-Nicoud und X. Ronot. *In situ* hybridization in living cells: Detection of RNA molecules. *Exp. Cell Res.*, 231:226, 1997.
- [98] G. J. Palm. Green fluorescent protein: Extensive characterization aids the use as a marker protein for many applications. *Quantum Bionews*, October:1, 1998.
- [99] G. J. Palm, A. Zdanov, G. A. Gaitanaris, R. Stauber, G. N. Pavlakis und A. Wlodawer. The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nat. Struct. Biol.*, 4(5):361, 1997.
- [100] A. G. Palmer und N. L. Thompson. Theory of sample translation in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 51(2):339, 1987.
- [101] A. G. Palmer und N. L. Thompson. High-order fluorescence analysis of model protein clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:6148, 1989.
- [102] A. G. Palmer und N. L. Thompson. Intensity dependence of high order autocorrelation functions in fluorescence correlation spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 60:624, 1989.
- [103] A. G. Palmer und N. L. Thompson. Optical spatial intensity profiles for high order autocorrelation in fluorescence spectroscopy. *Appl. Opt.*, 28:1214, 1989.
- [104] A. Partikian, B. Olveczky, R. Swaminathan, Y. Li und A. S. Verkman. Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix. *J. Cell Biol.*, 140(4):821, 1998.
- [105] G. Patterson, R. Day und D. Piston. Fluorescent protein spectra. *J. Cell Sci.*, 114(5):837, 2001.
- [106] J. B. Pawley, Hrsg. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Plenum Press, New York, 2. Auflage, 1995.
- [107] T. Pederson. Thinking about a nuclear matrix. *J. Mol. Biol.*, 277(2):147, 1998.
- [108] T. Pederson. Half a century of “the nuclear matrix”. *Mol. Biol. Cell*, 11(3):799, 2000.

- [109] N. Periasamy und A. S. Verkman. Analysis of fluorophore diffusion by continuous distributions of diffusion coefficients: application to photobleaching measurements of multicomponent and anomalous diffusion. *Biophys. J.*, 75(1):557, 1998.
- [110] Perkin-Elmer Optoelectronics. *Single photon counting module SPCM-AQR series*. Vaudreuil, 2000.
- [111] R. Peters, A. Brunger und K. Schulten. Continuous fluorescence microphotolysis: A sensitive method for study of diffusion processes in single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(2):962, 1981.
- [112] N. O. Petersen. Scanning fluorescence correlation spectroscopy. I. Theory and simulation of aggregation measurements. *Biophys. J.*, 49(4):809, 1986.
- [113] N. O. Petersen, P. L. Hoddellius, P. W. Wiseman, O. Seger und K. E. Magnusson. Quantitation of membrane receptor distributions by image correlation spectroscopy: Concept and application. *Biophys. J.*, 65(3):1135, 1993.
- [114] N. O. Petersen, D. C. Johnson und M. J. Schlesinger. Scanning fluorescence correlation spectroscopy. II. Application to virus glycoprotein aggregation. *Biophys. J.*, 49(4):817, 1986.
- [115] R. D. Phair und T. Misteli. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 404(6778):604, 2000.
- [116] D. W. Pierce, N. Hom-Booher und R. D. Vale. Imaging individual green fluorescent proteins. *Nature*, 388(6640):338, 1997.
- [117] J. C. Politz. Use of caged fluorochromes to track macromolecular movement in living cells. *Trends Cell. Biol.*, 9(7):284, 1999.
- [118] J. C. Politz, E. S. Browne, D. E. Wolf und T. Pederson. Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(11):6043, 1998.
- [119] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling und B. P. Flannery. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- [120] H. Qian. Inverse poisson transformation and shot noise filtering. *Rev. Sci. Instrum.*, 61(8):2088, 1990.
- [121] H. Qian. A mathematical analysis for the brownian dynamics of a DNA tether. *J. Math. Biol.*, 41(4):331, 2000.
- [122] H. Qian. Single-particle tracking: Brownian dynamics of viscoelastic materials. *Biophys. J.*, 79(1):137, 2000.
- [123] H. Qian und E. L. Elson. Distribution of molecular aggregation by analysis of fluctuation moments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:5479, 1990.
- [124] H. Qian und E. L. Elson. On the analysis of high-order moments of fluorescence fluctuations. *Biophys. J.*, 57(2):375, 1990.

- [125] H. Qian und E. L. Elson. Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy. *Appl. Opt.*, 30(10):1185, 1991.
- [126] H. Qian, G. M. Raymond und J. B. Bassingthwaite. Stochastic fractal behavior in concentration fluctuation and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. Chem.*, 80(1):1, 1999.
- [127] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren und P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.*, 22:169, 1993.
- [128] K. Rippe. Simultaneous binding of two DNA duplexes to the NtrC-enhancer complex studied by two-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biochemistry*, 39(9):2131, 2000.
- [129] J. Rička und T. Binkert. Direct measurement of a distinct correlation function by fluorescence cross correlation. *Phys. Rev. A*, 39:2646, 1989.
- [130] M. J. Saxton. Anomalous diffusion due to obstacles: A Monte Carlo study. *Biophys. J.*, 66(2/I):394, 1994.
- [131] M. J. Saxton. Single-particle tracking: Effects of corrals. *Biophys. J.*, 69(2):389, 1995.
- [132] M. J. Saxton. Anomalous diffusion due to binding: A monte carlo study. *Biophys. J.*, 70(3):1250, 1996.
- [133] U. Scheer und R. Hock. Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11(3):385, 1999.
- [134] H. Scher und M. Lax. Stochastic transport in a disordered solid. I. Theory. *Phys. Rev. B*, 7(10):4491, 1973.
- [135] H. Scher und E. W. Montroll. Anomalous transit-time dispersion in amorphous solids. *Phys. Rev. B*, 12(6):2455, 1975.
- [136] H. Scher, M. F. Shlesinger und J. T. Bendler. Time-scale invariance in transport and relaxation. *Physics Today*, January:26, 1991.
- [137] P. Schwille, J. Bieschke und F. Oehlenschläger. Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: The analytical and diagnostic potential of diffusion studies. *Biophys. Chem.*, 66(2/3):211, 1997.
- [138] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti und W. W. Webb. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys. J.*, 77(4):2251, 1999.
- [139] P. Schwille, S. Kummer, A. A. Heikal, W. E. Moerner und W. W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(1):151, 2000.
- [140] C. Seidel, L. Brand und R. Günther. Verfahren und Anordnung zur Bestimmung vorgegebener Eigenschaften von Zielpartikeln eines Probenmediums. *Deutsche Patentanmeldung 197 02 914.0*, 1997.

- [141] O. Seksek, J. Biwersi und A. S. Verkman. Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *J. Cell Biol.*, 138(1):131, 1997.
- [142] C. J. R. Sheppard und H. J. Matthews. Imaging in high-aperture optical systems. *J. Opt. Soc. Am. A*, 4(8):1354, 1987.
- [143] S. M. Sorscher und M. P. Klein. Profile of a focused collimated laser beam near the focal minimum characterized by fluorescence correlation spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 51:98, 1980.
- [144] E. H. K. Stelzer. The intermediate optical system of laser-scanning confocal microscopes. In J. B. Pawley, Hrsg., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, S. 139. Plenum Press, New York, 2. Auflage, 1995.
- [145] E. H. K. Stelzer und S. Lindek. Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: Confocal theta microscopy. *Opt. Commun.*, 111:536, 1994.
- [146] D. Stoffler, B. Fahrenkrog und U. Aebi. The nuclear pore complex: From molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11(3):391, 1999.
- [147] N. Stuurman, S. Heins und U. Aebi. Nuclear lamins: Their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.*, 122(1-2):42, 1998.
- [148] J. A. Sullivan. Cells alive. <http://www.cellsalive.com>, 2001.
- [149] R. Swaminathan, S. Bicknese, N. Periasamy und A. S. Verkman. Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: Translational diffusion of a small fluorescent solute measured by total internal reflection-fluorescence photobleaching recovery. *Biophys. J.*, 71(2):1140, 1996.
- [150] R. Swaminathan, C. P. Hoang und A. S. Verkman. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: Cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys. J.*, 72(4):1900, 1997.
- [151] B. R. Terry, E. K. Matthews und J. Haseloff. Molecular characterisation of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217(1):21, 1995.
- [152] M. Tewes. *Aufbau eines Experiments zur Fluoreszenz Kreuzkorrelationsspektroskopie, Erweiterung der theoretischen Grundlagen und biologische Anwendungen*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1998.
- [153] N. L. Thompson. Fluorescence correlation spectroscopy. In J. R. Lakowicz, Hrsg., *Techniques*, Band 1 aus *Topics in fluorescence spectroscopy*, S. 337. Plenum Press, New York, 1991.
- [154] R. Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:509, 1998.
- [155] P. J. Verschure, I. van der Kraan, E. M. Manders und R. van Driel. Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J. Cell Biol.*, 147(1):13, 1999.

- [156] P. J. Verveer, Q. S. Hanley, P. W. Verbeek, L. J. van Vliet und T. M. Jovin. Theory of confocal fluorescence imaging in the programmable array microscope (PAM). *J. Microscopy*, 189(6):192, 1998.
- [157] A. Volkmer, V. Subramaniam, D. J. Birch und T. M. Jovin. One- and two-photon excited fluorescence lifetimes and anisotropy decays of green fluorescent proteins. *Biophys. J.*, 78(3):1589, 2000.
- [158] M. Wachsmuth, W. Waldeck und J. Langowski. Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 298(4):677, 2000.
- [159] M. A. Wall, M. Socolich und R. Ranganathan. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat. Struct. Biol.*, 7(12):1133, 2000.
- [160] M. D. Wang, M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles und S. M. Block. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science*, 282(5390):902, 1998.
- [161] R. H. Webb und C. K. Dorey. The pixilated image. In J. B. Pawley, Hrsg., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, S. 55. Plenum Press, New York, 2. Auflage, 1995.
- [162] P. Wedekind, U. Kubitscheck, O. Heinrich und R. Peters. Line-scanning microphotolysis for diffraction-limited measurements of lateral diffusion. *Biophys. J.*, 71(3):1621, 1996.
- [163] G. Wedemann. *Simulation von Struktur und Strukturregulation von Chromatin*. Dissertation, Bergische Universität – Gesamthochschule Wuppertal, 1999.
- [164] J. White und E. Stelzer. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell. Biol.*, 9(2):61, 1999.
- [165] J. Widengren, Ü. Mets und R. Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.*, 99(36):13368, 1995.
- [166] T. Winkler, U. Kettling, A. Koltermann und M. Eigen. Confocal fluorescence coincidence analysis: An approach to ultra high-throughput screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(4):1375, 1999.
- [167] P. W. Wiseman und N. O. Petersen. Image correlation spectroscopy. II. Optimization for ultrasensitive detection of preexisting platelet-derived growth factor-beta receptor oligomers on intact cells. *Biophys. J.*, 76(2):963, 1999.
- [168] D. Yarbrough, R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz und S. J. Remington. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(2):462, 2001.
- [169] Carl Zeiss Mikroskopie. *Die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie*. Jena, 2000.
- [170] D. Zink, T. Cremer, R. Saffrich, R. Fischer, M. F. Trendelenburg, W. Ansorge und E. H. Stelzer. Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum. Genet.*, 102(2):241, 1998.

- [171] R. M. Zirbel, U. R. Mathieu, A. Kurz, T. Cremer und P. Lichter. Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res.*, 1(2):93, 1993.
- [172] A. Zumbusch und G. Jung. Single molecule spectroscopy of the green fluorescent protein: A critical assessment. *Single Molecules*, 1(4):261, 2000.

Danksagung

Prof. Dr. Jörg Langowski danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit unter idealen Bedingungen mit vielen Freiheiten in seiner interdisziplinären Arbeitsgruppe am Deutschen Krebsforschungszentrum durchführen zu können.

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer danke ich für die Betreuung und Unterstützung seitens der Fakultät für Physik und Astronomie.

Thomas Weidemann danke ich für die Einführung in die FCS, viele Anregungen und Diskussionen nicht nur fachlicher Natur, Spaziergänge auf der Charles Street, Korrekturlesen und vieles mehr.

Tobias A. Knoch danke ich für viele gute Ideen und Diskussionen, Histon-AFP-exprimierende Zellen und Hilfe bei einigen Experimenten.

Katalin Fejes-Tóth und Dr. Karsten Rippe danke ich für zahlreiche nette Stunden Rücken an Rücken, ergänzt durch Tipps und Hilfe vielerlei Art und für das Korrekturlesen.

Gabriele Müller und Dr. Waldemar Waldeck danke ich für die umfassende Unterstützung bei der Zellkultur und vielen biologischen Fragestellungen.

Allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Mein größter Dank gilt natürlich Steffi und Jule, ohne deren Liebe und Fröhlichkeit diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, sowie unseren Eltern, die uns den Weg der letzten Jahre ermöglicht haben.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis Mai 2001 in der Abteilung Biophysik der Makromoleküle (Leitung Prof. Dr. Jörg Langowski) am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg angefertigt.

